

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

Background Field of 1. invention Generally this invention relates to the field of cardiopathy and heart angiopathy. More specifically, this invention is turned to the approach of decreasing atheroma formation in the mammals by administration of parao KISONAZE (paraoxonase) -1 (PON-1) and (manifestation protein with antioxidation activity over hydrolysis activity and low-density lipoprotein (LDL) to organic phosphate) **.

[0002]

2. Background Atheroma formation (atherogenesis) and hyperlipidemia are accepted well now by being related closely. Atheroma formation is accompanied by are recording (build-up) of the cholesterol in the inner bark of an artery wall, and formation of the continuing plaque. A plaque may split and, finally may cause the thrombosis which may bring about apoplexy or myocardial infarction. About two gestalten, high density (HDL), and low consistency (LDL) lipoprotein of a lipoprotein, LDL is correlated with plaque formation and a positive and, on the other hand, HDL is considered to be an anti-atheroma plasticity through a reverse cholesterol transport mechanism (refer to following).

[0003]

A lipid transport system is divided into two main paths, an exogenous path (the food triglyceride and cholesterol which are absorbed by the small intestine), and an endogenous path (the triglyceride and cholesterol which are secreted by liver). It is thought that the reverse cholesterol transport system carried by HDL participates in both paths, and is a mechanism based on the main non-receptors for removal of the cholesterol by HDL. HDL2 and HDL3 to which two subsets of HDL are participating in reverse cholesterol transportation. Unripe HDL accumulates cholesterol from a cell membrane. The enzyme lecithin cholesterol acyltransferase ("LCAT") through which it circulates combines with HDL, and esterifies isolation cholesterol, and esterification cholesterol is caused that it should move into a core (core). HDL3 particle accumulates cholesteryl ester, and HDL3 turns into HDL2 which is rich in cholesteryl ester as it is accumulated. Subsequently the cholesteryl ester in HDL2 is exchanged for a triglyceride with cholesteryl ester transporter protein. HDL2 can be changed, it can return to HDL3, and this can accumulate the further isolation cholesterol next. HDL is considered to be an anti-atheroma plasticity through a reverse cholesterol transport system for the capacity to incorporate superfluous isolation cholesterol.

[0004]

Oxidation of LDL is an important midcourse phase in formation of an atheroma plasticity plaque. Before LDL is taken in by the macrophage and forms the foam cell which is the important component of an atherosclerosis plaque, as for it, it turns out that an alteration must be received (Steinberg, D., et al., "Beyond cholesterol: modifications of low-density cholesterol that increase its atherogenicity", N.Engl.J.Med.320:915 (1989)). Probably in Inn BIBO, oxidation is the steady format of an LDL alteration. Oxidation LDL is chemotaxis for the monocyte through which it circulates, and is cell damage nature, and it not only contributes to formation of a foam cell, but carries out the failure of the inner-bark function.

[0005]

As for HDL, it turns out that LDL oxidation is controlled, and this is other possible mechanisms and

HDL can fall atherosclerosis by this. S. Parthasarathy and an associate With LDL changed in oxidization, the incubation of HDL Bringing about inhibition of production of a thiobarbituric acid reactivity product (TBARS) was shown (it Parthasarath(ies)). S. et al. and "High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein, "Biochem.Biophy.Acta 1044:275 (1990). However, the mechanism about the antioxidation function of HDL is not known yet. In other researches, Klimov and others injected with Homo sapiens HDL3200mg the rabbit made hypercholesterolemia by the cholesterol feed. The total plasma compound diene and trien carried out 20-30% reduction in 6 hours after injection, and stopped in the level which decreased till after [injection] 24 hours (Klimov, A.N., et al., "Antioxidative activity of high density lipoproteins in vivo, "Atherosclerosis 100:13 (1993)).

[0006]

In the patient to whom an anti-oxidant therapy has hypercholesterolemia and a coronary artery disease, it turns out that an endothelial cell function is improved (Anderson, TJ, et al., "The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy - endothelium-dependent coronary vasomotion, "N.Engl.J.Med.332:488 (1995)). The Cambridge Heart Oxidant Study (CHAOS) divided 2,002 patients who have the proved coronary artery disease at random to vitamin E, 400-800I.U., or a placebo. The anti-oxidant therapy fell heart blood vessel death and the primary last point of the non-lethality MI 47% after the middle trace in 1.4 (Stephens (47 to 64 events), N.G., et al., "Randomized controlled trial of Vitamin E in Patients with coronary disease:Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS), "Lancet 347:781 (1996)).

[0007]

Parao KISONAZE (PON) is protein secreted by liver, and is found out mainly in a blood serum. The identifier originates in the capacity which hydrolyzes organic phosphate paraoxon (paraoxon) in Inn BIBO. Three sorts of known allele molds PON exist. Blood serum parao KISONAZE / aryl esterase (PON-1) is A-esterase of 43-45kDa in 354 residue compounded with HDL (Kelso, G.J., et al., "Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma, "Biochemistry 33:832-839 (1994)). It is common knowledge to participate in hydrolysis of several sorts of organic phosphate insecticides (Murphy, S.D.in Toxicology:The Basic Science of Poisons (eds.Doull, J., Klassen, and C. --)) & Amdur, M.357-408, Macmillan, New Yoak,;(1980) Tafuri, J., et al., "Organophosphate poisoning, "Ann.Emerg.Med.16:193-202 (1987). PON2 and PON3 are known allele variants with a similar array. It is not known whether PON2 or PON3 will be discovered by Inn BIBO. U.S. Pat. No. 5,792,639 and 5,629,193 (Human Genome Science) counter those use for a nerve protective effect in order to counteract the poison for organophosphate by the Homo sapiens parao KISONAZE gene, its related vector, the host cell by which the transformation was carried out, and Inn BIBO. The DNA array in which an application for patent is carried out by HGS seems to be the array of PON2 based on homology retrieval. Alignment of PON1 and a PON2 nucleic-acid array shows identity 69%. About use of parao KISONAZE which should decrease the atheroma formation described by this specification, it is not suggested in any of '639 or '193 patent.

[0008]

A PON family member's bioactive was not known till recent years. It was claimed that PON may be playing a role of an Inn BIBO anti-oxidant which can fall peroxidation of LDL in recent years (Mackness, M.I., et al., "HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation, "Atherosclerosis 115:243-253 (1995)). however, the same total theory like platelet activating factor acetyl hydrolase To HDL other enzymes of a proper The same role That it may be performing It stated (). [Stafforini, D.M.,] [et] al., "The plasma PAF acetylhydrolase prevents oxidative modification of low density lipoprotein, "J.Lipid Mediators Cell Signaling 10:53 (1994).

[0009]

Research of some Homo sapiens ensembles clarified the significant relation between the common polymorphism of PON1 gene, and a coronary artery disease (CAD) (Ruiz, J., et a;). l., "Gln-Arg 192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes,"Lancet 346:869-872(1995);Serrato,M.,et al., "A variant of human paraoxonase/arylesterase(HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease, "J.Clin.Invest.96:3005-3008 (1995). PON-1 [moreover,] In LDL which oxidized The phospholipid to which the last inflammatory one of a certain kind found out oxidized The capacity to destroy It has (). [Mackness, M.I.,] [et] al.,

"Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein, "FEBS Lett 286:152-154(1991);Watson, A.D., and et al., "Protective effect of HDL associated paraoxonase-inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein, "J.Clin.Invest.96:2882-2891 (1995). Moreover, the mechanism is not established yet except suggesting that parao KISONAZE is involving.

[0010]

Mackness and others ("Is Paraoxonase related to Atherosclerosis, "Chem.-Biol.Interactions 87:161-171 (1993)) is arguing about the proof of the antioxidation-role about parao KISONAZE. In this report, they studied the blood serum parao KISONAZE activity in a patient with two ensembles, the familial hypercholesterolemia (FH), and IDDM (insulin dependency diabetes mellitus) which are easy to show the symptoms of atherosclerosis. In two illnesses, both FH(s), and IDDM to which they express high generating of atherosclerosis; the percentage of the low ensemble of a parao KISONAZE activity group showed the significant thing to increase statistically. Furthermore, Mackness and others studied the possible role of parao KISONAZE by adding small quantity under existence of LDL under the oxidization condition in the LDL oxidization model of the Inn vitro. They concluded that there was activity also 300 times rather than HDL or its subfraction in parao KISONAZE preventing LDL oxidization. However, how parao KISONAZE defends LDL to oxidation in this model concludes that they must be determined in addition, and it argues about some possibility.

[0011]

By hereditary research by the mouse, PON1 mRNA and protein level show correlation contrary to main artery lesion size (Shih, D.M., et al., "Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model, "J.Clin.Invest.97:1630-1639 (1996)). These data have suggested that it may have some relation to the HDL level and CAD by which PON-1 activity was observed in ensemble research (Tall, A., "Plasma high density lipoproteins:Metabolism and relationship to atherogenesis, "J.Clin.Invest.86:379-384 (1990)).

[0012]

Familial hypercholesterolemia is a genetically determined disease which brings about the chronic high level of the serum cholesterol which reaches and contains LDL both HDL(s). Moreover, the disease is characterized as an LDL receptor deficit. It is autosome dominant [which has spread evaluation called one homozygote per ensemble 1 million]. The LDL receptor is usually participating in incorporation of LDL by hepatocyte, and the continuing exclusion. Are recording of LDL in these patients is as a result of an LDL receptor deficit. The high fixed incidence-rate ensemble by the founder effect exists, and the French Canadian is known best. Heterozygote shows the symptoms of xanthoma in 20 to 30 years old, and is accompanied by atherosclerosis cardiopathy in 40 to 50 years old, and a woman at the age of 50 to 60 in a male. By the cardiac infarction usually caused by too much plaque are recording, a homozygote cannot be survived, if it exceeds 30 years old. They have total cholesterol of the 500-1,000 mg/dl range, show the symptoms of xanthoma at the age of six, and show the symptoms of the coronary artery disease which has symptoms at the age of ten.

[0013]

The therapy of an LDL receptor defective has many problems. A homozygote does not answer a HMG-CoA reductase inhibitor (they do not have the functional LDL receptor which should be carried out up-regulation), and heterozygote answers normal one half. Niacin is hard to be permitted although it is effective for reducing LDL. A non-materia medica-therapy contains the plasmapheresis method, the partial ileum bypass, original vena-cava splitting (protocaval shunt), and the liver transplantation for every week.

[0014]

The clear needs to the alternative therapy for those patients showing hypercholesterolemia, especially familial hypercholesterolemia exist.

[0015]

Outline of invention This invention is turned to the approach of decreasing the atheroma formation including prescribing PON-1 or its functional equivalent of an effective dose for the patient in medicine manufacture in the mammals. It is shown in this specification in the animal model that it

can act on a surprising thing in order that PON-1 may decrease the main artery lesion region which is the omen of a future atherosclerosis plaque (atheroma). Generally this discovery expresses the leading materia medica-therapy for FH which should be a benefit for hypercholesterolemia.

[0016]

The purpose of this invention is offering the approach of decreasing the atheroma formation in the mammals by prescribing PON-1 or its functional equivalent of an effective dose for the patient in medicine manufacture, and decreasing the possibility to atherosclerosis by it.

[0017]

The purpose of others of this invention is offering the new therapy for the mammals suffered from FH.

[0018]

Detailed description of invention Definition The vocabulary "parao KISONAZE" points out the variant which exists in either of three sorts of known alleles of a known glycoprotein enzyme, PON1, PON2, and PON3, and those nature as parao KISONAZE ("PON"). [i.e.,] PON isolated from the blood serum is called "blood serum parao KISONAZE" and PON-1. PON-1 is the only known allele discovered, and it exists mainly in a blood serum. In Homo sapiens, there is PON-1 known variant in the amino acid location 192 called a "192Q" variant with anti-atheroma formation activity higher than other variants. In the ensemble of the Europe family line, it is concluded that a distribution condition is polymorphism with low and a high activity sub gestalt. 192R is a low activity variant. The vocabulary "PON-1 and its functional equivalent" means native PON-1, all parao KISONAZE with the antioxidation activity over an effective atheroma plasticity lipid to the same extent or fragmentation, a deletion mutant, a permutation variant, or a derivative at least.

[0019]

PON-1 can change in a specific amino-acid-residue location as in other protein, and it can produce other variants of native PON-1 ("MUTEIN (mutein)"). According to whether amino acid substitution affects folding of an active site, substrate specificity, and protein etc., there are many these variants, there are, or they may have the same native activity. [few] this invention persons give priority to and choose other congener alterations and permutations (namely, thing with the minimum effect of the secondary tertiary structure on proteinic) in a location of PON-1. Such a congener permutation is The. Atlas of Protein Sequence and Structure It sets to 5 (1978) and they are Dayhoff and EMBO. J. and the thing described by Argos in 8:779-785 (1989) are included. For example, the amino acid belonging to one of the next groups expresses a congener permutation. : - ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr;

-cys,ser,tyr,thr;

-val,ile,leu,met,ala,phe;

-lys,arg,his;

- phe, tyr, trp, and his; -- and -- - asp and glu

Moreover, this invention persons give priority to and choose additional intermolecular bridge formation, the alteration which does not introduce the part for unsuitable disulfide bond formation, or a permutation. For example, it is known that PON-1 has two cysteine residue in the wild type locations 41 and 352 of a mature array.

[0020]

PON-1 -- from a Homo sapiens blood serum or human plasma -- it can isolate (Gan, KN., et al., "Purification of human serum paraoxonase/arylesterase.Evidence for one esterase catalyzing both activities, "Drug Metab.Dispos.19(1):100-6 (1991)) -- or it can create through the rearranging method. U.S. Pat. No. 5,792,639 and 5,629,193 are turned to the approach of creating and using PON2 gene, protein, and PON-2, and those manifestation approaches are clearly included in this specification completely. The person with the usual technique can use the instruction in this specification, and can discover PON-1 protein without an excessive experiment for them combining the known array (SwissProt Accession No.Q16052;ID PON1_HUMAN) of PON1.

[0021]

Similarly, when it desires 192Q or to create some variants of other, a DNA array isolates the DNA array which is carrying out the code of the wild type PON, or compounds, and, subsequently to a desired codon, is built by changing the native codon about a location 192 by site-directed

mutagenesis. This technique is common knowledge. For example, Mark et al., "Site-specific Mutagenesis of The Human Fibroblast Interferon Gene", Proc.Natl.Acad.Sci.USA U.S. Pat. No. 4,588,585, reference which are included in this specification by 81, pp.5662-66(1984);, and citation. [0022]

In the technical field concerned, assay of the biological activity of the PON-1 glycoprotein of this invention can be carried out by all suitable known approaches. Parao KISONAZE assay and aryl esterase assay by which two approaches are indicated in this specification. (The following 1. approaches, reference) .

[0023]

Medicine manufacture constituent The PON-1 protein (reference is made by this specification as an "activity compound" again) of this invention is incorporable into a medicine manufacture constituent suitable for administration. Typically, such a constituent contains protein and the carrier who can approve in medicine manufacture. It means that vocabulary "the carrier which can approve in medicine manufacture" which is used here contains what kind of thing which suits medicine manufacture administration and which reaches and is similar to all solvents, the quality of a dispersion medium, a coating agent, anti-bacteria and an antifungal, an isotonicity, an absorption retarder, and it. Use of the such a medium and drugs for the matter [activity / in medicine manufacture] is common knowledge in the technical field concerned. Something can consider those use in a constituent except for the case where the medium or drugs of common use is as incongruent as an activity compound. For example, it is known that PON-1 is calcium dependent protein with some calcium coupling loops (Sorenson et al., "Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase, "Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:7187-7191 (1995)). Moreover, a supplementary activity compound may be incorporated into a constituent.

[0024]

The medicine manufacture constituent of this invention is pharmaceutical-preparation-ized so that the meant route of administration may be suited. the inside of that the example of a route of administration is parenteral, for example, a vein, and a hide, hypodermically, taking orally (for example, inhalation), and transderma (local) -- it passes and membrane and anus administration are included. the liquids and solutions or suspension the inside of parenteral and a hide or for subcutaneous administration may also contain the drugs, for example, the sodium chloride, or dextrose for adjustment of the following component:sterilization diluent, for example, water for injection, physiological sodium chloride solution, non-volatile oil, a polyethylene glycol, a glycerol, propylene glycol, other synthetic solvent; anti-bacteria agents, for example, benzyl alcohol, or a methyl BARABEN; anti-oxidant, for example, an ascorbic acid, a tocopherol or a sodium bisulfite; buffer, for example, acetate, citrate or phosphate, and tonicity. An acid, a base, for example, a hydrochloric acid, or a sodium hydroxide can adjust pH. A parenteral preparation object can be enclosed into the busy amount vial made from ampul, a disposable syringe, glass, or plastics.

[0025]

A medicine manufacture constituent suitable for an injection application contains the sterilization powder for extempore preparation of a sterilized water solution agent (in the case of water-soluble) or a dispersant and a sterile parenteral solution agent, or a dispersant. In intravenous administration, a suitable carrier contains physiological sodium chloride solution, sterilization water, CremophorELTM (BASF, Parsippany, NJ), or phosphoric-acid buffer brine (PBS). It must be a liquid to extent which is in the condition with which it can inject sterile [a constituent] easily in all cases. It must be stably saved to a contamination operation of a microorganism like bacteria and a fungus under the conditions of manufacture and storage. A carrier may be the solvent or the quality of a dispersion medium containing water, ethanol, polyols (for example, glycerol, propylene glycol, a liquid polyethylene glycol, etc.), and those suitable mixture. A suitable fluidity may be maintained by use of a coating agent like lecithin, maintenance of the particle size which is demanded in the case of a dispersant, and use of a surfactant. Antibacterial [various] and an antifungal agent, for example, paraben, chlorobutanol, a phenol, an ascorbic acid, etc. can attain defense of a microorganism operation. Probably, in many cases, it will be desirable to contain an isotonicity agent, for example, a saccharide, polyalcohol, for example, a mannitol, a sorbitol, and a sodium chloride in a constituent. Durability absorption of the constituent for injection is brought about by

containing in a constituent the drugs with which absorption is delayed, for example, aluminum monostearate, and gelatin.

[0026]

The liquids and solutions for sterile injection can be prepared by incorporating, and carrying out sterile filtration of the activity compound (for example, PON-1 protein or anti-PON-1 antibody) continuously in the amount demanded, into the suitable solvent containing one or the combination object of a component enumerated previously, so that it may be required. Generally, a dispersant is prepared by incorporating an activity compound into the sterile medium containing other components demanded from the quality of a dispersion medium and the component enumerated previously of a basis. The preparation approach suitable in the case of the sterile powder for preparation of the liquids and solutions for sterile injection is the vacuum drying and freeze drying which obtain the powder of a desired component as a solution with which powder plus ** sterile filtration of the active principle was carried out added by something. Since proteinic storage life is increased, albumin, HDL, a saccharide, for example, a sucrose, or a stabilizer like calcium ion may contain.

[0027]

Generally an oral constituent contains an inactive diluent or an edible carrier. They are enclosed into a gelatine capsule agent, or can be compressed into a tablet. For the purpose of oral therapy administration, an activity compound can incorporate an additive and it can be used for it in the gestalt of a tablet, the trochiscus, or a capsule. Moreover, preparation ** of the fluid carrier can be used and carried out for the use as mouth wash, and the compound in a fluid carrier is applied in taking orally in this case, and an oral constituent is swish(ed) and breathed out, or is swallowed. The binder which may suit in medicine manufacture, and/or an assistant may be contained as some constituents. Even if a tablet, a pill, a capsule, the trochiscus, etc. contain either of the compounds with the following component or a similar property, good :binder, For example, a microcrystal cellulose, a tragacanth gum, or gelatin; An additive, For example, starch or a lactose, disintegrator, for example, an alginic acid, Primogel, or amylum maydis; Lubricant, For example, magnesium stearate or Sterotes; lubricant (glidant), for example, colloidal-silicon-dioxide; sweetening agent, for example, sucrose, or saccharin; or an aromatizing agent, for example, peppermint, a methyl salicylate, or the Orange flavor.

[0028]

By administration by inhalation, a compound is sent with the gestalt of aerosol spraying from the pressurization container containing suitable propellants, for example, a gas like a carbon dioxide, a dispenser, or a sprayer.

[0029]

Moreover, it passes through systemic administration and it is good also by membrane or the endermic means. It passes and the suitable penetrating agent to the barrier which should permeate is used in pharmaceutical preparation in membrane or dermal administration. Generally, such a penetrating agent is known in the technical field concerned, for example, contains a surface active agent, bile salt, and a fusidic acid derivative by permucosal administration. Permucosal administration may be carried out through use of a nasal spray agent or suppositories. Generally in dermal administration, an activity compound is pharmaceutical-preparation-ized by an ointment like known, ointment (salves), gel, or cream pharmaceuticals in the technical field concerned.

[0030]

Moreover, a compound can be prepared with the gestalt of the suppositories for anus delivery (using the suppository base of common use-like cocoa butter and other glycerides), or maintenance clysters.

[0031]

In the one embodiment, an activity compound is prepared using the carrier who protects a compound to the quick exclusion from the body like the emission control pharmaceutical preparation containing transplantation and a microencapsulation delivery system.

[0032]

Biodegradability, a biocompatibility polymer, for example, ethylene vinyl acetate, a polyanthus hydride (polyanhydride), polyglycolic acid, a collagen, poly ortho ester, and the Pori acetic acid can

be used. Probably, such a preparation approach of pharmaceutical preparation will be clear to this contractor. Moreover, an ingredient is Alza. Corporation and Nova Pharmaceuticals and the commercial item from Inc. can be obtained. Moreover, liposome suspension (the liposome which makes a target the infected cell using the monoclonal antibody to a viral antigen is included) can use it as a carrier who can approve in medicine manufacture. These can be prepared according to a known approach to this contractor that is described by U.S. Pat. No. 4,522,811.

[0033]

Administration is made easy and it is especially a best policy to pharmaceutical-preparation-ize taking orally or a parenteral constituent to dosage unit dosage forms, in order to equalize a dosage. ; each unit which points out that the dosage unit dosage forms used here distinguish physically the unit for which it is suitable as a unit dosage for the patient who should be treated contains the amount as which the activity compound calculated so that a desired curative effect might be induced was determined beforehand combining a required medicine manufacture carrier. The specification about the dosage unit dosage forms of this invention is directly described according to a limit of the proper in the technique which combines such an activity compound for the therapy of the peculiar property and the peculiar specific curative effect which should be attained of an activity compound, and each man, respectively.

[0034]

The common guide about a dosage and a constituent is Remington's by E.W.Martin incorporated by citation. Pharmaceutical It can use in Science.

[0035]

Furthermore, this invention counters the method of diagnosing disposition to hypercholesterolemia by investigating the level of PON-1 through which a native circulates in the mammals. The result of the animal trial shown in this specification shows that PON-1 administration can fall formation of the fatty streaks (fatty streak) in a mouse main artery organization according to a surprising factor. In this way, the detection and the trace of PON-1 level in the mammals will become a diagnosis of the atheroma formation which is the sign of next atherosclerosis. Assay which here about parao KISONAZE or aryl esterase is shown will become the foundation of such a diagnostic approach. The approach can evaluate the hereditary difference between the sub ensembles who discover the phenotypic variation of PON-1 which a normal twist also has in a high heart blood vessel event and a high correlation. For example, PON-1 192Q phenotype correlated with parao KISONAZE activity higher than 192R phenotype. Probably, being based on whether it is the paddle gap which measures the ratio of these [which exist in whether assay measures phenotype separately,/, and an individual] two phenotypes, and predicting each susceptibility to their atherosclerosis by it is expected.

[0036]

Moreover, in gene therapy application, use of the DNA array which is carrying out the code of PON-1 is expected. The gene therapy application considered includes the therapy of those illnesses it is expected according to the capacity of PON-1 which decreases lipid oxidation like the atherosclerosis that it is to offer an effective therapy, and the illness which carries out another response to lipid oxidation level. The familial hypercholesterolemia whose symptoms are shown by lack of a manifestation of an LDL receptor is one of the illnesses which brings about the very high level of the cholesterol and the triglyceride through which it circulates, and a related lipid.

[0037]

Partial delivery of PON-1 using gene therapy can provide a target field with a therapy agent. Both the in vitro and the Inn BIBO gene therapy method can be considered. Some methods of transmitting a therapy gene to a fixed cell population potentially are learned. For example, Mulligan, "The Basic Science Of Gene Therapy", Science, 260:926-31 (1993), reference. These approaches contain the following. : 1 direct gene transfer. For example, Wolff et al., "Direct Gene transfer Into Mouse Muscle In Vivo", Science, 247:1465-68 (1990), reference; 2) Liposome medium DNA transfer. For example Caplen et al., "Liposome-mediated CFTR Gene Transfer To The Nasal Epithelium Of Patients With Cystic Fibrosis" and Nature Med.3:39-46 (1995);Crystal, "The Gene As A Drug", Nature Med.1:15-17(1995);Gao and Huang, "A Novel Cationic Liposome Reagent For Efficient Transfection Of Mammalian Cells", Biochem.Biophys.Res.Comm., 179:280-85 (1991), reference;

3) Retrovirus medium DNA transfer. For example, Kay et al., "In Vivo Gene Therapy Of Hemophilia B:Sustained Partial Correction In Factor IX-Deficient Dogs", Science, 262:117-19 (1993);Anderson, "Human Gene Therapy", Science, 256:808-13 (1992), reference.
[0038]

4) DNA virus medium DNA transfer. Such a virus contains adenovirus (vector preferably based on Ad-2 or Ad-5), a Herpes virus (vector preferably based on a herpes simplex virus), and a parvovirus (the vector preferably based on a "defect" or a non-autonomy parvovirus, the vector more preferably based on an adeno-associated virus, vector most preferably based on AAV-2). For example, Ali et al., "The Use Of DNA Virus As Vectors For Gene Therapy", Gene Therapy, 1:367-84 (1994); U.S. Pat. No. 4,797,368 included in this specification by the citation and U.S. Pat. No. 5,139,941 included in this specification by the citation, reference.
[0039]

Probably, selection of the specific vector system for transmitting the gene in question changes with various factors. One important factor is a target cell ensemble's property. Although a retrovirus vector is studied widely and it is used in many gene therapy application, generally these vectors are not suitable for being infected with a nondividing cell. Furthermore, a retrovirus has carcinogenic possibility.
[0040]

They have a large host range, and adenovirus can be infected with a quiescent state, a terminally differentiated cell, for example, neurone, or hepatocyte, and has the advantage of not expressing carcinogenic in essence. For example, Ali et al., the above, p.367, reference. It seems that adenovirus does not have the inclusion to a host genome. Since they exist out of a chromosome, generally the danger of the insertion mutagenesis decreases. Ali et al., the above, p.373.
[0041]

An adeno-associated virus shows an advantage similar to the vector based on adenovirus. However, AAV shows the site specific inclusion in the human chromosome 19. Ali et al., the above, p.377.
[0042]

In the suitable embodiment, PON-1 which is carrying out the code of the DNA of this invention is used in the gene therapy for the disease based on a lipid, for example, FH, and the heart blood vessel complication which happens from other diseases like the non-insulin dependency diabetes mellitus.
[0043]

According to this embodiment, the patient who needs it a diagnosis, coincidence, or immediately after that is provided with the gene therapy by DNA which is carrying out the code of PON-1 or MUTEIN of this invention.
[0044]

The proficient engineer can evaluate that any gene therapy vector containing PON-1DNA or DNA of MUTEIN of PON-1 may be used according to this mode. The technique of building such a vector is known. For example, Anderson, W.F., "Human Gene Therapy", Nature, 392:25-30(1998);Verma, I.M., and Somia, N., and "Gene Therapy-Promises, Problems, and and Prospects" Nature, 389:239-242 (1998), reference. The installation to the target site of a PON-1DNA content vector is executable using a known technique. Furthermore, although this invention is concretely explained by the following example, it should not be interpreted as this limiting this invention, but it should be used in order to support it. The contents of all patents mentioned by this specification, patent application, and bibliography are completely incorporated by the citation.
[0045]

Example The I. approach Mouse and diet . LDLR KO mouse model is animal model recognized in order to predict a medicine manufacture candidate's materia medica-activity in the field of atheroma formation. The LDL receptor of a mouse required for removal of the atheroma plasticity LDL By homology recombination Deletion is carried out (). [Ishibashi S.,] [et] al. and "Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery, "J.Clin.Invest.92(2):883-893 (1993). These mice are susceptibility especially at the atheroma formation (fatty streaks) in those primary arteries (primary), when high fat food is able to be given. The LDL receptor knock out (LDLR KO) mouse of a two-month ** scalpel is Jackson. It was purchased from Laboratory (Bar Harbor, Maine), and was

maintained by the fat Chow (chow) diet (Harlan Teklad, Madison, WI) 6%. By PON replacement (replacement) research, it is Metz LDLR of 50 animals of three-month **. KO mouse was divided into the following five groups with ten mice per group. : Group 1: It was made the sacrifice on a base group and the 0th.

[0046]

The 2:4 week Chow diet groups of groups and these mice could give a fat Chow diet 6%, and were made into the sacrifice on the 28th. PON-1 activity was measured by parao KISONAZE assay in groups 4 and 5.

[0047]

The 3:4 week quantity fat diet groups of groups and these mice could give high fat food food for four weeks, and were made into the sacrifice on the 28th.

[0048]

The 4:4 week high fat food food + buffer injection of groups and these mice could give high fat food food for four weeks (1 day -28 day), and received 80micro of buffer injection I to intramuscular on 1, 3, 6, 8, 10, 13, 15, and the 17th. Subsequently, the mouse received 80micro of intraperitoneal buffer injection I on 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, and the 27th. Subsequently, the mouse was made into the sacrifice on the 28th.

[0049]

The 5:4 week high fat food food +PON injection of groups, and these mice High fat food food can be given for four weeks (1 day -28 day), and it is Homo sapiens PON-1 192Q (PON-1) to intramuscular. Bert Du LA () [Gan, KN.,] [et] al., "Purification of human serum paraoxonase/arylesterase.Evidence for one esterase catalyzing both activities and "Drug The approach described by Metab.Dispos.19(1):100-106 (1991) is used. it was refined from the human plasma donor of isogamous conjugation about 192Q variation -- 80micro (800microg, parao KISONAZE activity 290 unit) of injection I was received on 1, 3, 6, 8, 10, 13, 15, and the 17th. Subsequently, a mouse is intraperitoneal Homo sapiens PON-1. 80micro of 192Q injection I was received on 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, and the 27th. Subsequently, the mouse was made into the sacrifice on the 28th.

[0050]

High fat food food contained a fat, 1.25% cholesterol, and 0.5% cholic acid sodium (Teklad, Madison, WI) 15.75%. By groups 4 and 5, plasma PON-1 activity was measured on the 28th (i. after [p. injection] 24 hours) at the both 7 Japanese eye (i. after [m. injection] 24 hours), and sacrifice time. By groups 1, 2, and 3, PON-1 activity was measured in the plasma sample collected at the sacrifice time. At the sacrifice time, the overnight fast was carried out and the mouse was killed. Blood, the heart, and liver were collected for the further analysis.

[0051]

PON-1 activity and lipid assay . PON-1 activity As a substrate Organophosphate paraoxon Parao KISONAZE assay to be used () [Furlong, C.E.et al.,] ["Spectrophotometric assays for the enzymatic hydrolysis of] the active metabolites of chlorpyrifos and parathion by plasma In paraoxonase/arylesterase and "Anal.Biochem.180:242-247 (1989) or as a substrate Phenyl acetate Aryl esterase assay to be used () [Furlong, C.E.et al.,] ["Role of genetic polymorphism of human plasma paraoxonase/arylesterase] in hydrolysis of the insecticide metabolites chlorpyrifos oxon and In paraoxon and "Am.J.Hum.Genet.43:230-238 (1988) It was measured by either. If it says simply, at parao KISONAZE assay, 5micro of plasma I will be 1.2mM paraoxon, 2.0MNaCl, and 0.1MTris. HCl It was mixed with the substrate solution containing pH8.5 and 2.0mM CaCl_2 . Generation of p-nitrophenol was measured at the room temperature as change of the absorbance (O. D.) in 405nm [/ in 5 minutes]. Moreover, the standard curve was built by measuring O.D.405 of p-nitrophenol of various concentration. Parao KISONAZE activity 1 unit is defined as p-nitrophenol 1nmole generated in 1 minute. At aryl esterase assay, 1micro of plasma I is 3.26mM phenyl acetate and 9.0mMTris. HCl It was mixed with 1ml of substrate solutions containing pH8.0 and 0.9mM CaCl_2 . Generation of a phenol was measured at the room temperature as change of the absorbance (O. D.) in 270nm [/ in 2 minutes]. Subsequently, aryl esterase activity was computed using the molar extinction coefficient (1,310M \cdot 1cm $^{-1}$) about a phenol. Aryl esterase activity 1 unit is defined as phenol 1micromole generated in 1 minute. About all groups, plasma total cholesterol, HDL

cholesterol, VLDL/LDL cholesterol, and a triglyceride In the plasma sample collected using the enzyme-actuation using the terminal point of an enzyme at the sacrifice time It was measured (). [Mehrabian, M.,] [et] al., "Influence of the apoA-II gene locus on HDL levels and fatty streak development in mice, "Arterioscler.Thromb.13:1-10 (1993).

[0052]

Main artery lesion measurement . The upper part section of the heart and a base artery is obtained, and use of main artery lesion measurement needs to carry out embedding into an OCT compound (Tissue-Tek OCT Compound-Sakura Finetek USA Inc., Torrence, CA), and to be frozen at the sacrifice time. The frozen sections in every [which begins from the location where an aortic valve appears] 10 micrometers in thickness are collected about about 500-micrometer length. It is dyed by Oilred O (Oil Red O, Sigma Chemical Company, St.Louis, Missouri), and these intercepts are a hematoxylin (Hematoxylin aqueous formula, Biomeda Corp., Foster City, CA) and Fast. Counterstain is carried out by Green (Fast Green FCF, Sigma, St.Louis, Missouri). The lipid content area in 25 intercepts is determined using a microscope eyepiece grid. Subsequently, the average lesion area per intercept is calculated (Mehrabian, M., et al., "Influence of the apoA-II gene locus - HDL levels and fatty streak development in mice, "Arterioscler.Thromb.13:1-10 (1993)).

[0053]

Western-blot-analysis . Purification Homo sapiens PON-1 of various amounts 192Q (400, 200, 100, 50 ng/lane) and mouse HDL1microl (equivalent to 6micro of mouse plasma l) For electrophoresis The load was carried out on denaturation polyacrylamide gel. (Modifier:2X buffer:0.5 MTris-HCl and pH 6.8 which are used, 2.5ml; up to glycerol, 2ml; 10%SDS, 4ml; 0.1% bromophenol blue, 0.5 ml;beta-mercaptoethanol, and 10.0ml of 0.5ml; water) . Subsequently, it transferred to the protein by which fractionation was carried out on the nitrocellulose paper (Hybond-ECLnitrocellulose, Amersham, Buckinghamshire, UK). subsequently -- being such -- being the same -- a nitrocellulose - - a blot -- four -- a piece -- a degree -- a solution -- one -- a ** -- one -- an hour -- incubating -- having had -- : -- (-- one --) -- injection -- four -- a week -- after -- a buffer -- injecting -- having had -- a mouse -- from -- preservation -- plasma -- 1:500 -- diluents -- (2) It is Homo sapiens PON-1 after four weeks of injection. 1:500 diluents of the preservation plasma from the mouse injected with 192Q, (3) It is Homo sapiens PON-1 after one week of injection. 1:500 diluents of the preservation plasma from the mouse injected with 192Q, (4) -- 1:1000 diluents (a rabbit -- anti- -- mouse PON-1) of a rabbit antibody to mouse PON-1 Diana Shih and Ling-jie It was generated using recombination mouse PON-1 discovered by Gu and UCLA NIOKERU E. KORJ (E. coli) by the officially non-announced result. Subsequently, it was washed by PBS containing 20 and, subsequently the blot incubated for 1 hour with the 0.1%Tween-secondary anti-rabbit IgG antibody (Amersham, Buckinghamshire, UK) conjugated with HRP. Subsequently, the blot was washed and the image was visualized using the ECL Western-blotting detection reagent (Amersham, Life Science, Inc., Arlington Heights, Illinois) from Amersham.

[0054]

II. example Example 1. Homo sapiens PON-1 LDLR injected with 192Q Diachronic study of plasma PON-1 activity in KO mouse Metz LDLR of three animals maintained by the chow diet KO mouse is Homo sapiens PON-1 respectively. It was injected with 290 units of 192Q to intramuscular. Blood samples were collected just before injection (time amount 0), after [8 and 24] injection, and in 48 hours. Subsequently, plasma PON-1 activity was measured using aryl esterase assay. As shown in drawing 1 , after [8 and 24] injection and average plasma PON-1 activity in 48 hours were 107% of the activity of time amount 0, 125%, and 109% (time amount 0 to 24 hours, p= 0.003). This data shows that an intramuscular injection is the effective approach of sending PON-1 into a mouse. However, the increment in PON-1 activity in these mice was expected, and was small. [of reliance]

[0055]

example 2. [] PON-1 192Q replacement research The design of experiment was already described in the approach. Plasma PON-1 activity was measured in 24 hours after the 3rd intramuscular injection on the 7th by the group 4 (four-week high fat food food + buffer injection) and the group 5 (4 week high fat food food + Homo sapiens PON-1 192Q 290 unit injection). The value which was each group 10 mouse on the 7th and which is; Shown is the average from two independent parao KISONAZE assays. ; parao KISONAZE assay which was each group 9 mouse on the 28th.

[0056]

As shown in drawing 2 A and 2B, as for the high fat food food +PON-1 injection group, it turned out that PON-1 activity high 27% is shown as compared with a high fat + buffer injection group in the 7th day (drawing 2 (p= 0.03) A). However, as for the (drawing 2 B) high fat food food +PON-1 injection group, it turned out on the 28th that it only has 50% of PON-1 activity as compared with it of a high fat + buffer injection group (p< 0.0001). this invention persons are Homo sapiens PON-1 injected with PON-1 activity reduction of the PON-1 injection group in the 28th day. I thought that it was probably caused by the immune response of the mouse to 192Q.

[0057]

example 3. [] LDLR injected with Homo sapiens PON-1 Detection of anti-Homo sapiens PON-1 antibody in KO mouse Purification Homo sapiens PON-1 of various amounts 192Q (400, 200, 100, 50 ng/lane) and mouse HDL The load of the 1microl (equivalent to 6micro of mouse plasma l) was carried out on denaturation polyacrylamide gel for electrophoresis. Subsequently, it transferred to the protein by which fractionation was carried out on the nitrocellulose paper. It is specifically related with drawing 3 A-D. These four same nitrocellulose blots subsequently 1:500 diluents of the preservation plasma from the mouse injected with the buffer after one of the following solutions, and :Panel A and four weeks of buffer injection which incubated for 1 hour; Panel B It is Homo sapiens PON-1 after four weeks of injection. 1:500 diluents of the preservation plasma from the mouse injected with 192Q; [Panel C] It is Homo sapiens PON-1 after one week of injection. 1:500 diluent [of the preservation plasma from a mouse]; injected with 192Q, Panel D, and 1:1000 diluents of a rabbit antibody to mouse PON-1. Subsequently, the blot was washed by PBS containing 0.1%Tween-20, and it incubated with HRP and the conjugated secondary antibody for 1 hour. Subsequently, the blot was washed and the image was visualized using the ECL technique. Although the four-week buffer injection mouse did not have an antibody to Homo sapiens PON-1 in those plasma as shown in Panel A, on the other hand, the four-week PON-1 injection mouse contained the antibody to Homo sapiens PON-1 in those plasma (panel B). In the plasma of an one-week PON-1 injection mouse, any anti-Homo sapiens PON-1 antibodies were not detected (panel C). Although there was more little rabbit anti-mouse PON-1 antibody as mouse PON-1 as shown in Panel D, both Homo sapiens PON-1 was detected.

[0058]

Since the antibody to Homo sapiens PON-1 did not carry out the cross reaction of the fall of PON-1 activity in a PON-1 injection animal to mouse PON-1 protein in the 28th day, it is unthinkable to be directly caused by the interaction between mouse PON-1 and an antibody. Since it is thought that Homo sapiens PON-1 exists on the same HDL particle as mouse PON-1, recognition of PON-1 containing the HDL particle by the antibody will promote the path clearance of these HDL particles, and I will cause the removal of mouse PON-1 on the same particle in this way.

[0059]

example 4. [] lipid level The lipid level of the plasma sample collected at the time of a sacrifice was inspected. As shown in Table 1, there was no significant difference in the plasma lipid level between a four-week quantity fat + buffer injection mouse and a four-week quantity fat group. As compared with the buffer injection mouse, a PON-1 injection mouse has a little increments in a triglyceride (p= 0.005) with a little reduction in both total cholesterol (p= 0.04), and VLDL / LDL cholesterol (p= 0.04) level, and an interesting thing was same in HDL cholesterol level. Therefore, the PON-1 injection mouse had few atheroma plasticity lipid profiles as compared with the buffer injection group.

[0060]

[Table 1]

表1:

犠牲時点でのLDLR KOマウスの血漿PON-1活性および脂質レベル

	PON-1活性 ¹	総コレステロール ²	VLDL/LDL コレステロール ²	HDL コレステロール ²	トリグリセリド ²
基礎	329 ± 21	291 ± 15	206 ± 17	86 ± 3	162 ± 16
4-週 Chow	420 ± 11	332 ± 10	230 ± 10	101 ± 2	318 ± 25
4-週 HF ³	105 ± 6	2315 ± 175	2289 ± 174	27 ± 3	44 ± 11
4-週 HF ³ + Buffer	112 ± 9	2213 ± 145	2190 ± 145	23 ± 2	26 ± 4
4-週 HF ³ + PON-1	56 ± 5	1862 ± 63	1836 ± 62	26 ± 2	44 ± 4

¹ 示される値は、各群9～10動物の平均値±S.Eである。
単位は、パラオキシナーゼ活性単位/血漿mlである。

² 示される値は、各群9～10動物の平均値±S.Eである。
単位は、mg/dlである。

³ HFは高脂肪食餌を意味する。

[0061]

example 5. [] main artery lesion this invention persons inspected the main artery fatty-streaks formation in these mice next. Three-month ** scalpel LDLR KO mouse (10 mice / group) (base group) [whether it will be made a sacrifice on the 0th, and] They are supply (four-week chow) and four-week high fat food food about a four-week chow diet Supply (four-week HF) and high fat food food supply + buffer injection (four-week HF+ buffer) or high fat food food supply + Homo sapiens PON-1 Either of the 192Q injection (4 week HF+PON) was carried out. It is at the termination time of four-week treatment, and the mouse was made into the sacrifice. The hearts were collected and the score of the main artery lesion area was carried out. In the group 4 (four-week HF+ buffer) and the group 5 (four-week HF+PON), in order to avoid 1 time and bias with a non blind (non-blind), the score of the lesion size was carried out once in the blind format. The score at both the times was very similar. A significant difference was not able to be found out in the main artery lesion size between four-week quantity fat and four-week quantity fat + buffer injection groups (drawing 4). From non blind scoring, the average lesion sizes of buffer injection (group 4) and a PON-1 injection (group 5) group were 34222**8008 and a 12864**1985mm²/intercept, respectively. From blind scoring, the average lesion sizes of buffer injection and a PON-1 injection group were 32422**7470 and a 13383**1850mm²/intercept, respectively. therefore, a blind or the non blind method -- even if it uses any, a very similar result obtains -- having -- 4 week quantity fat +PON-1 It was illustrated that a 192Q injection group has a small main artery lesion area more nearly intentionally than both a four-week quantity fat + buffer injection group and a four-week quantity fat group. For the result, PON-1 replacement is LDLR. It has suggested that it is an effective method of reducing main artery fatty streaks in KO mouse.

[0062]

It will be PON-1 if it summarizes. As compared with the mouse with which the mouse injected with 192Q was injected with the buffer, it turned out that it has PON-1 activity which rose on the 7th, and

the PON-1 activity of the lower level on the 28th. However, when main artery lesion formation is inspected on the 28th, 60% (approximation) of reduction large forge fire it is surprising in main artery lesion size compares with the mouse injected with the buffer, and it is PON-1. It was found out in the mouse injected with 192Q. : whose possible explanation of the PON-1 low activity of the PON-1 treatment mouse in the 28th day is as follows -- Homo sapiens PON-1 [in / to the 1st / a PON-1 injection mouse] Probably, the generation and the titer of an antibody to 192Q start behind time, and stop low till experiment termination. So, almost all the time amount under research, PON-1 with which it was injected 192Q was effective for LDL oxidation and following and preventing the atherosclerosis. To the 2nd, PON-1 prevents initiation of the atherosclerosis, i.e., prevention of LDL oxidation. Therefore, prevention of an immune response, and the fall (Mackness, M.I., et al., and the above --; Watson, A.D., et al., and the above --; Shih, D.M. et al., and" -- Mice lacking serum) of a monocyte supplement into the bottom cell of an inner bark paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis, "Nature In 394:284-287 (1998) But probably, the PON replacement was the most effective than the last two weeks of research between the first two weeks of research rather, when assuming that it was effective. Therefore, even if the PON-1 injection mouse had PON-1 activity lower than a buffer injection mouse in the last of the experiment on the 28th, developing a main artery lesion in addition did not almost have them.

[0063]

This contractor could check without recognizing many equivalents with the specific mode of this invention described by this specification, or using the everyday experiment beyond this. For example, probably PON-2 and PON-3 have antioxidation activity similar to PON-1, and they will be equally useful in the approach of this invention. Moreover, other deletion or permutation variation will also offer the similar functional equivalent. It means that such an equivalent is included by the next pneumonia and the next range of an application for patent.

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1]

Homo sapiens PON-1 LDLR after 290 units of 192Q receive intramuscular (i. m.) injection It is the display by the graph of the plasma PON-1 (aryl esterase assay) activity of KO mouse. Time amount (0.8.24 and 48 hours) breeding of the mouse was directed and carried out, and PON-1 activity was measured.

[Drawing 2 A and 2B]

It is the bar graph which shows Homo sapiens PON-1 amount which will exist in the mouse blood serum of 24 hours after injection on any 7th (drawing 2 A) or the 28th (drawing 2 B). The contrast mouse received the buffer.

[From drawing 3 A to 3D]

It is the western blotting which shows generation of anti-Homo sapiens PON-1 antibody in the mouse which covered research progress and was treated by Homo sapiens PON-1.

[Drawing 4]

LDLR in a PON-1 therapy **** contrast therapy group It is the bar graph which compares the main artery lesion size of KO mouse.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-526610

(P2003-526610A)

(43) 公表日 平成15年9月9日 (2003.9.9)

(51) IntCl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
A 6 1 K 38/46		A 6 1 K 31/7115	2 G 0 4 5
31/7115		35/76	4 B 0 6 3
35/76		48/00	4 C 0 8 4
48/00		A 6 1 P 3/06	4 C 0 8 6
A 6 1 P 3/06		9/10	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 40 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-583326(P2000-583326)
(86) (22) 出願日 平成11年11月23日 (1999.11.23)
(85) 翻訳文提出日 平成13年5月15日 (2001.5.15)
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 9 / 2 7 8 0 6
(87) 国際公開番号 W O 0 0 / 0 3 0 4 2 5
(87) 国際公開日 平成12年6月2日 (2000.6.2)
(31) 優先権主張番号 0 9 / 1 9 9 , 6 7 2
(32) 優先日 平成10年11月25日 (1998.11.25)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 バイエル・コーポレーション
BAYER CORPORATION
アメリカ合衆国ペンシルヴァニア州15205
ピッツバーグ、バイエルロード100
(72) 発明者 ラドトケ、クラウゼーベーター
アメリカ合衆国ノースカロライナ州27502
アベックス・マクストンクレストドライブ
2416
(74) 代理人 弁理士 小田島 平吉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アテローム形成を減少するためのPON-1の使用方法

(57) 【要約】

本発明は、製薬的に有効量のPON-1もしくはその機能の等価物を、それを必要とする患者に投与することを含む、哺乳類におけるアテローム形成を減少する方法に對向される。また、製薬組成物、ならびにネイティブの循環するPON-1のレベルを調査することによる、高コレステロール血症への素因を診断する方法も、本明細書に含まれる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 製薬的に有効量のPON-1もしくはその機能的等価物を投与することを含む、哺乳類におけるアテローム形成を減少する方法。

【請求項2】 該有効量が、約 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ の範囲である、請求項1の方法。

【請求項3】 該PON-1が、組み換えヒト・パラオキシナーゼを含有する、請求項1の方法。

【請求項4】 該PON-1が、ヒト血漿由来のPON-1を含有する、請求項1の方法。

【請求項5】 該PON-1が、ヒト血清由来のPON-1を含有する、請求項1の方法。

【請求項6】 該PON-1が、PON-1 192Qを含有する、請求項1の方法。

【請求項7】 哺乳類における生来の循環するPON-1のレベルを調査することによる、高コレステロール血症への素因を診断する方法。

【請求項8】 製薬的に許容しうるキャリアーとの混合状態でPON-1を含んでなる、PON-1タンパク質をそれを必要とする患者に投与するための製薬組成物。

【請求項9】 製薬的に有効量のPON-1もしくはその機能的等価物を投与することを含む、哺乳類における高コレステロール血症を治療する方法。

【請求項10】 製薬的に有効量のPON-1 DNA、またはPON-1等価機能をもつPON-1 DNAのムテインを、機能的PON-1が哺乳類において検出できるように該哺乳類に投与することを含む、哺乳類におけるアテローム形成を減少する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

背景1. 発明の分野

本発明は、一般に、心臓病および心臓血管病の分野に関する。より具体的には、本発明は、パラオキシナーゼ (paraoxonase) - 1 (PON-1)、(有機ホスフェートに対する加水分解活性および低密度リポタンパク質 (LDL) に対する抗酸化活性をもつ発現タンパク質)、の投与による、哺乳類においてアテローム形成を減少する方法に向けられる。

【0002】

2. 背景

アテローム形成 (atherogenesis) と高脂血症が、密接に関連していることは、今ではよく受け入れられている。アテローム形成は、動脈壁の内皮内のコレステロールの蓄積 (build-up) および続いてのプラークの形成を伴う。プラークは裂けて、最後には、卒中もしくは心筋梗塞をもたらすかもしれない血栓形成を引き起こすことがある。リポタンパク質の2つの形態、高密度 (HDL) および低密度 (LDL) リポタンパク質について、LDLは、プラーク形成とポジティブに相関され、一方HDLは、逆のコレステロール輸送機構をとおして抗アテローム形成性であると考えられる (以下参照)。

【0003】

脂質輸送系は、2つの主要経路、外因性経路 (小腸によって吸収される食物トリグリセリドおよびコレステロール) および内因性経路 (肝臓によって分泌されるトリグリセリドおよびコレステロール) に分かれる。HDLによって媒介される逆のコレステロール輸送系は、両経路に関与し、そしてHDLによるコレステロールの除去のための主要な非レセプターに基づくメカニズムであると考えられる。HDLの2つのサブセットが、逆コレステロール輸送に関与している、HDL2およびHDL3。未熟なHDLは、細胞膜からコレステロールを蓄積する。循環する酵素レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ (「LCAT」) は、HDLと結合し、そして遊離コレステロールをエステル化して、コア (

core) 中に移動すべくエステル化コレステロールを惹起する。HDL 3 粒子は、コレステリルエステルを蓄積し、そしてそれが蓄積するにつれて、HDL 3 は、コレステリルエステルに富むHDL 2になる。HDL 2中のコレステリルエステルは、次いで、コレステリルエステル輸送タンパク質によってトリグリセリドと交換され。HDL 2を変換してHDL 3に戻し、これは、次ぎに、さらなる遊離コレステロールを蓄積することができる。HDLは、過剰の遊離コレステロールを取り込む能力のために、逆コレステロール輸送系をとおして抗アテローム形成性であると考えられる。

【0004】

LDLの酸化は、アテローム形成性プラークの形成における重要な中間段階である。LDLが、マクロファージによって摂取されて、アテローム硬化プラークの重要な成分である泡沫細胞を形成する前に、それは改変を受けねばならないことが分かっている (Steinberg, D., et al., "Beyond cholesterol: modifications of low-density cholesterol that increase its atherogenicity", N. Engl. J. Med. 320:915 (1989))。イン・ビボでは、酸化は、多分、LDL改変のもっとも定常的な形式である。酸化LDLは、泡沫細胞の形成に寄与するだけでなく、また循環する単球にとって走化性であり、細胞障害性であり、そして内皮機能を障害する。

【0005】

HDLは、LDL酸化を抑制することがわかっており、これは、その他の可能性のあるメカニズムであって、これによって、HDLはアテローム性動脈硬化症を低下することができる。S. Parthasarathyと共同研究者は、酸化的に改変されたLDLとともにHDLのインキュベーションが、チオバルビツール酸反応性生産物 (TBARS) の産生の阻害をもたらすことを示した (Parthasarathy, S. et al., "High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein

n, " Biochem. Biophys. Acta 1044:275 (1990))。しかしながら、HDLの抗酸化機能に関するメカニズムはまだ分かっていない。その他の研究では、Klimovらは、コレステロール給餌によって高コレステロール血症にされたウサギに、ヒトHDL₃200mgを注射した。総血漿複合ジエンおよびトリエンは、注射後6時間に20-30%減少し、そして注射後24時間までその減少したレベルにおいて留まった (Klimov, A. N., et al., "Antioxidative activity of high density lipoproteins in vivo," Atherosclerosis 100:13 (1993))。

【0006】

抗酸化剤療法は、高コレステロール血症および冠動脈疾患を有する患者において内皮細胞機能を改善することが分かっている (Anderson, T.J., et al., "The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion," N. Engl. J. Med. 332:488 (1995))。The Cambridge Heart Oxidant Study (CHAOS) は、立証された冠疾患を有する患者2,002人を、ビタミンE、400~800 I. U. もしくはプラセボに対してランダムに分けた。1.4年の中間追跡後、抗酸化剤治療は、心臓血管死および非致死性MIの1次最終点を47パーセント低下した (47対64イベント) (Stephens, N. G., et al., "Randomized controlled trial of Vitamin E in Patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS)," Lancet 347:781 (1996))。

【0007】

パラオキソナーゼ (PON) は、肝臓によって分泌されるタンパク質であり、主として血清中に見いだされる。その名前は、イン・ビボにおいて有機ホスフェート・パラオキソン (paraoxon) を加水分解する能力に由来する。3種

の既知の対立遺伝子型PONが存在する。血清パラオキシナーゼ／アリールエステラーゼ (PON-1) は、HDLと複合した354残基で43-45 kDaのA-エステラーゼである (Kelso, G. J., et al., "Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma," Biochemistry 33:832-839 (1994))。それは、数種の有機ホスフェート殺虫剤の加水分解に関与していることは周知である (Murphy, S. D. in Toxicology: The Basic Science of Poisons, (eds. Doull, J., Klassen, C., & Amdur, M.) 357-408, Macmillan, New York, (1980); Tafuri, J., et al., "Organophosphate poisoning," Ann. Emerg. Med. 16:193-202 (1987))。PON2およびPON3は、類似の配列をもつ既知の対立遺伝子変異体である。PON2もしくはPON3がイン・ビボで発現されるか否かは知られていない。米国特許第5,792,639号および同第5,629,193号 (Human Genome Science) は、ヒト・パラオキシナーゼ遺伝子、その関連するベクターおよび形質転換された宿主細胞、ならびにイン・ビボで有機リン酸エステルを解毒するためおよび神経保護効果のためのそれらの使用に対向される。HGSによって特許請求されるDNA配列は、相同性検索に基づいてPON2の配列のようである。PON1およびPON2核酸配列の整列は、69%同一性を示す。本明細書に記述されるアテローム形成を減少させるべきパラオキシナーゼの使用については、'639もしくは'193特許のいずれにおいても示唆されていない。

【0008】

PONファミリーメンバーの生理活性は、近年まで知られていなかった。近年、PONが、LDLの過酸化を低下できるイン・ビボ抗酸化剤としての役割を演じているかもしれないということが主張された (Mackness, M. I., et al., "HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation")。

n, " Atherosclerosis 115:243-253 (1995))。しかしながら、同じ総説は、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼのように、HDLに固有の他の酵素もまた、同じ役割を演じているかもしれないことを述べた (Stafforini, D. M., et al., " The plasma PAF acetylhydrolase prevents oxidative modification of low density lipoprotein, " J. Lipid Mediators Cell Signaling 10:53 (1994))。

【0009】

いくつかのヒト集団の研究は、PON1 遺伝子の共通の多型性と冠動脈疾患 (CAD) の間の有意な繋がりを明らかにした (Ruiz, J., et al., " Gln-Arg 192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes, " Lancet 346:869-872 (1995) ; Serrato, M., et al., " A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease, " J. Clin. Invest. 96:3005-3008 (1995))。また、PON-1は、酸化されたLDLにおいて見いだされるある種の前炎症性の酸化されたリン脂質を破壊する能力をもつ (Mackness, M. I., et al., " Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein, " FEBS Lett 286:152-154 (1991) ; Watson, A. D., et al., " Protective effect of HDL associated paraoxonase-inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein, " J. Clin. Invest. 96:2882-2891 (1995))。また、

パラオキシナーゼが関与していることを示唆する以外、そのメカニズムはまだ確立されていない。

【0010】

Macknessら ("Is Paraoxonase related to Atherosclerosis," Chem. - Biol. Interactions 87:161-171 (1993)) は、パラオキシナーゼについての抗酸化的作用の証拠を議論している。この報告では、彼らは、アテローム性動脈硬化症を発症しやすい2つの集団、家族性高コレステロール血症 (FH) およびIDDM (インシュリン依存性真性糖尿病) をもつ患者における血清パラオキシナーゼ活性を研究した。彼らは、アテローム性動脈硬化症の高い発生を現す2つの疾病、両FHおよびIDDMにおいて、低いパラオキシナーゼ活性群の集団のパーセンテージが、統計的に有意な増加することを示した。さらに、Macknessらは、イン・ビトロのLDL酸化モデルにおいて、パラオキシナーゼの可能性のある役割を、酸化条件下、LDLの存在下で、少量を添加することによって研究した。彼らは、パラオキシナーゼが、LDL酸化を防ぐことにおいて、HDLもしくはそのサブフラクションよりも300倍も活性があると結論した。しかしながら、彼らは、パラオキシナーゼが、このモデルにおいて酸化に対してLDLをいかにして防御するかは、なお決定されなければならないと結論し、そしていくつかの可能性が議論されている。

【0011】

マウスによる遺伝的研究では、PON1 mRNAおよびタンパク質レベルは、大動脈病変サイズと逆の相関を示す (Shih, D. M., et al., "Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model," J. Clin. Invest. 97:1630-1639 (1996))。これらのデータは、PON-1活性が、集団研究において観察されたHDLレベルとCADに対して、いくつかの関係をもつかもしれないことを示唆している (Tall, A., "Plasma high density lipoprotein

s: Metabolism and relationship to atherogenesis," J. Clin. Invest. 86: 379-384 (1990))。

【0012】

家族性高コレステロール血症は、両HDLおよびLDLを含む血清コレステロールの慢性的高レベルをもたらす遺伝的疾患である。また、その疾患は、LDLレセプター欠損として特徴付けられる。それは、集団百万当たり1同型接合体という普及評価をもつ常染色体優性である。LDLレセプターは、通常は、肝細胞によるLDLの取り込みと、続いての排除に関与している。これらの患者におけるLDLの蓄積は、LDLレセプター欠損の結果である。創始者効果による一定の高い発生率集団が存在し、フレンチカナディアンがもっともよく知られているものである。異型接合体は、20-30才において黄色腫を発症し、男性において40-50才、そして女性において50-60才でアテローム硬化心臓病を伴う。同型接合体は、通常は、過度のプラーク蓄積によって惹起される心梗塞により、30才を超えては生き残れない。彼らは、500-1,000mg/dl範囲の総コレステロールを有し、6才で黄色腫を発症し、そして10才で症候のある冠動脈疾患を発症する。

【0013】

LDLレセプター欠損患者の治療は問題が多い。同型接合体は、HMG-CoAレダクターゼ阻害剤に応答せず（彼らは、上向き調節すべき機能的LDLレセプターをもたない）、そして異型接合体は、正常の半分に応答する。ナイアシンは、LDLを低下させるのに効果的であるが、許容されにくい。非薬物学的治療は、週毎の血漿搬出法、部分回腸バイパス、原大静脈分流（protocaval shunt）および肝臓移植を含む。

【0014】

高コレステロール血症、特に家族性高コレステロール血症を現しているそれらの患者のための代替療法に対する明らかなニーズが存在する。

【0015】

発明の概要

本発明は、製薬的に有効量のPON-1もしくはその機能的等価物を投与することを含む、哺乳類におけるアテローム形成を減少する方法に向けられる。驚くべきことに、PON-1が、将来のアテローム硬化プラーク（アテローム）の予兆である大動脈病変域を減少するために作用しうることが、動物モデルにおいて、本明細書に示される。この発見は、一般に、高コレステロール血症にとって恩恵であるべきFHのための有力な薬物学的治療を表す。

【0016】

本発明の目的は、製薬的に有効量のPON-1もしくはその機能的等価物を投与し、それによってアテローム性動脈硬化症への可能性を減少することによる、哺乳類におけるアテローム形成を減少する方法を提供することである。

【0017】

本発明のその他の目的は、FHに罹っている哺乳類のための新規な治療を提供することである。

【0018】

発明の詳細な記述

定義

用語「パラオキシナーゼ」は、パラオキシナーゼ（「PON」）として既知の糖タンパク質酵素の3種の既知対立遺伝子のいずれか、すなわちPON1、PON2およびPON3、ならびにそれらの天然に存在する変異体を指す。血清から単離されたPONは、「血清パラオキシナーゼ」、またPON-1と呼ばれる。PON-1は、発現される唯一の既知対立遺伝子であり、そして主として血清中に存在する。ヒトでは、他の変異体よりも高い抗アテローム形成活性をもつ「192Q」変異体と呼ばれるアミノ酸位置192における既知のPON-1変異体がある。ヨーロッパ家系の集団では、分布状態は、低および高活性サブ形態をもつ多型性であると見られる。192Rは、低活性変異体である。用語「PON-1およびその機能的等価物」は、少なくともネイティブPON-1と同程度に有効なアテローム形成性脂質に対する抗酸化活性をもつ、すべてのパラオキシナーゼもしくはフラグメント、欠失変異体、置換変異体または誘導体を意味する。

【0019】

PON-1は、他のタンパク質におけるように、特定のアミノ酸残基位置において変化されて、ネイティブPON-1の他の変異体を生じることができる（「ムテイン（mutein）」）。これらの変異体は、アミノ酸置換が、活性部位、基質特異性、タンパク質の折りたたみ等に影響を与えるかどうかに応じて、多いか、少ないか、または同じネイティブ活性をもつことがある。本発明者らは、PON-1の他の位置における同類改変および置換（すなわち、タンパク質の2次もしくは3次構造への最小の影響をもつもの）を優先して選択する。そのような同類置換は、The Atlas of Protein Sequence and Structure 5（1978）においてDayhoffによって、そしてEMBO J.，8：779-785（1989）においてArgosによって記述されたものを含む。例えば、次のグループの1つに属するアミノ酸が同類置換を表す：

- ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr;
- cys, ser, tyr, thr;
- val, ile, leu, met, ala, phe;
- lys, arg, his;
- phe, tyr, trp, his; および
- asp, glu.

また本発明者らは、付加的な分子間架橋もしくは不適当なジスルフィド結合形成のための部位を導入しない改変もしくは置換を優先して選択する。例えば、PON-1は、成熟配列の野生型位置41および352における2個のシステイン残基をもつことが知られている。

【0020】

PON-1は、ヒト血清もしくはヒト血漿から単離できる（Gan, K. N., et al., "Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities," Drug Metab. Dispos. 19(1):100-6 (1991)）か、または組み換え法をとって作成することができる。米国特

許第5, 792, 639号および同第5, 629, 193号は、PON2遺伝子、タンパク質およびPON-2を作成および使用方法に向けられ、そしてそれらの発現方法は、明らかに、本明細書に完全に組み入れられる。通常の技術をもつ者は、本明細書における教示を使用し、そしてそれらをPON1の既知配列 (SwissProt Accession No. Q16052; ID PON1_HUMAN) と組み合わせて、余計な実験なしにPON-1タンパク質を発現することができる。

【0021】

同様に、192Qもしくは何か他の変異体を作成することを望む場合は、DNA配列が、野生型PONをコードしているDNA配列を単離するか、または合成し、次いで、部位特異的変異誘発によって位置192についてのネイティブコドンをもつコドンに変換することによって構築される。この技術は周知である。例えば、Mark et al., "Site-specific Mutagenesis of The Human Fibroblast Interferon Gene", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, pp. 5662-66 (1984); および引用によって本明細書に組み入れられる米国特許第4, 588, 585号、参照。

【0022】

本発明のPON-1糖タンパク質の生物学的活性は、当該技術分野において既知のすべての適当な方法によってアッセイすることができる。2つの方法が本明細書において開示される、パラオキシナーゼ・アッセイおよびアリアルエステラーゼ・アッセイ。(以下の、I. 方法、参照)。

【0023】

製薬組成物

本発明のPON-1タンパク質(また、「活性化合物」として本明細書に言及される)は、投与のために適当な製薬組成物中に組み入れることができる。そのような組成物は、典型的には、タンパク質および製薬的に許容しうるキャリアーを含有する。ここに使用されるような用語「製薬的に許容しうるキャリアー」は、製薬投与に適合するいかなるおよびすべての溶媒、分散媒質、コーティング剤

、抗細菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤、およびそれに類するものを含むことを意図する。製薬的に活性な物質のためのそのような媒質および薬剤の使用は、当該技術分野において周知である。何か慣用の媒質もしくは薬剤が、活性化化合物と不適合である場合を除いて、組成物におけるそれらの使用が考えられる。例えば、PON-1は、いくつかカルシウム結合ループをもつ、カルシウム依存性タンパク質であることが知られている (Sorenson et al., "Recosideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7187-7191 (1995))。また、補足の活性化化合物が、組成物中に組み入れられてもよい。

【0024】

本発明の製薬組成物は、その意図した投与経路に適合するように製剤化される。投与経路の例は、非経口的、例えば静脈内、皮内、皮下、経口（例えば吸入）、経皮（局所的）、経粘膜および肛門投与を含む。非経口、皮内もしくは皮下適用のための液剤もしくは懸濁剤は、次の成分：滅菌希釈剤、例えば注射用水、生理的食塩水、不揮発油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールもしくは他の合成溶媒；抗細菌剤、例えばベンジルアルコールもしくはメチルパラベン；抗酸化剤、例えばアスコルビン酸、トコフェロールもしくは重亜硫酸ナトリウム；バッファー、例えば酢酸塩、クエン酸塩もしくはリン酸塩、および張性の調整のための薬剤、例えば塩化ナトリウムもしくはデキストロースを含んでもよい。pHは、酸もしくは塩基、例えば塩酸もしくは水酸化ナトリウムにより調整できる。非経口調製物は、アンプル、使い捨て注射器、またはガラスもしくはプラスチックから作られた多用量バイアル中に封入することができる。

【0025】

注射用途のために適当な製薬組成物は、滅菌水溶液剤（水溶性の場合）もしくは分散剤および無菌注射液剤もしくは分散剤の即席調製のための滅菌散剤を含む。静脈内投与では、適当なキャリアーは、生理的食塩水、制菌水、Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) もしくはリン酸バッ

ァー食塩水（PBS）を含む。すべての場合に、組成物は、無菌でなければならず、そして容易に注射しうる状態である程度まで液体でなければならない。それは、製造および貯蔵の条件下で安定でなければならず、そして細菌および真菌のような微生物の汚染作用に対して保存されねばならない。キャリアーは、例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコール等）およびそれらの適当な混合物を含有する溶媒もしくは分散媒質であってもよい。適当な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティング剤の使用、分散剤の場合に要求される粒径の維持、および界面活性剤の使用によって維持されてもよい。微生物作用の防御は、種々の抗菌および抗かび剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸等によって達成できる。多くの場合、等張剤、例えば、糖類、ポリアルコール例えばマンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムを、組成物中に含有することが好ましいであろう。注射用組成物の持続性吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物中に含有することによってもたらされる。

【0026】

無菌注射用液剤は、要求されるように、先に列挙された成分の1つもしくは組み合わせ物を含む適当な溶媒中に、要求される量において活性化合物（例えば、PON-1タンパク質もしくは抗PON-1抗体）を組み入れ、続いて無菌濾過することによって調製することができる。一般に、分散剤は、基剤の分散媒質および先に列挙された成分からの要求される他の成分を含有する無菌媒質中に活性化合物を組み入れることによって調製される。無菌注射用液剤の調製のための無菌分散剤の場合には、好適な調製方法は、有効成分の粉末プラス予め無菌濾過された溶液としての何か追加される所望の成分の粉末を得る真空乾燥および凍結乾燥である。アルブミン、HDLもしくは糖類例えばスクロース、またはカルシウムイオンのような安定剤が、タンパク質の貯蔵寿命を増加するために含有されてもよい。

【0027】

経口組成物は、一般に、不活性な希釈剤もしくは食用キャリアーを含む。それ

らは、ゼラチンカプセル剤中に封入されるか、または錠剤に圧縮することができる。経口治療投与の目的では、活性化合物は、添加物を組み入れられ、そして錠剤、トローチ剤もしくはカプセル剤の形態において使用することができる。また、経口組成物は、口内洗剤としての使用のために、流体キャリアーを用いて調製されることができ、この場合、流体キャリアー中の化合物は、経口的に適用され、そしてswishされ、そして吐き出されるか、または飲み込まれる。製薬的に適合しうる結合剤、および／または助剤が、組成物の一部として含まれてもよい。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤等は、次の成分、または類似の性質をもつ化合物のいずれかを含有してもよい：結合剤、例えば微結晶セルロース、トラガントガムもしくはゼラチン；添加物、例えば澱粉もしくはラクトース、崩壊剤、例えばアルギン酸、Primogelもしくはトウモロコシ澱粉；滑沢剤、例えばステアリン酸マグネシウムもしくはSterotes；滑沢剤（glidant）、例えばコロイド状二酸化ケイ素；甘味剤、例えば蔗糖もしくはサッカリン；または着香剤、例えばペパーミント、サリチル酸メチルもしくはオレンジフレーバー。

【0028】

吸入による投与では、化合物は、適当な噴射剤、例えば二酸化炭素のような気体を含有する加圧容器もしくはディスペンサー、または噴霧器からのエアゾル噴霧の形態で送達される。

【0029】

また、全身的投与は、経粘膜もしくは経皮手段によってもよい。経粘膜もしくは経皮投与では、浸透されるべきバリアーに対する適当な浸透剤が、製剤において使用される。そのような浸透剤は、一般に、当該技術分野において既知であり、例えば、経粘膜投与では、界面活性剤、胆汁酸塩およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、鼻内噴霧剤もしくは坐剤の使用をとおして実施されてもよい。経皮投与では、活性化合物は、当該技術分野において一般に既知のような軟膏剤、軟膏（salves）、ゲル剤もしくはクリーム剤に製剤化される。

【0030】

また、化合物は、肛門送達のための坐剤（例えば、ココアバターおよび他のグ

リセリドのような慣用の坐剤基剤を用いて) もしくは保持浣腸剤の形態で調製することができる。

【0031】

1つの実施態様では、活性化合物は、身体からの迅速な排除に対して化合物を保護するキャリアーを用いて、移植およびマイクロカプセル化送達システムを含む、放出制御製剤のように調製される。

【0032】

生分解性、生体適合性ポリマー、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリアンヒドリド (polyanhydride)、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ酢酸が使用できる。そのような製剤の調製方法は、当業者には明らかであろう。また、材料は、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc. からの市販品を得ることができる。また、リポソーム懸濁液(ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を用いる感染細胞を標的とするリポソームを含む)が、製薬的に許容しうるキャリアーとして使用できる。これらは、例えば、米国特許第4, 522, 811号に記述されるような、当業者に既知の方法にしたがって調製することができる。

【0033】

投与を容易にし、そして用量を均等にするために、経口もしくは非経口組成物を用量単位剤形に製剤化するのが、特に得策である。ここに使用される用量単位剤形は、治療されるべき患者のために単位用量として適する単位を物理的に区別することを指す; 各単位は、必要な製薬キャリアーと組み合わせて、所望の治療効果を生むように計算された活性化合物の予め決定された量を含む。本発明の用量単位剤形についての仕様書は、活性化合物の独特の特性および達成されるべき特定の治療効果、ならびに個々の人の治療のためにそのような活性化合物を組み合わせる技術における固有の制限に応じて、それぞれ直接記述される。

【0034】

用量および組成物に関する一般指針は、引用によって組み入れられる、E. W. MartinによるRemington's Pharmaceutical Scienceにおいて利用できる。

【0035】

さらに、本発明は、哺乳類におけるネイティブの循環するPON-1のレベルを調査することによる、高コレステロール血症への素因を診断する方法に対向される。本明細書に示される動物試験の結果は、PON-1投与が、驚くべきファクターによって、マウス大動脈組織における脂肪条痕(fatty streak)の形成を低下できることを示している。かくして、哺乳類におけるPON-1レベルの検出および追跡は、後のアテローム性動脈硬化症の前兆であるアテローム形成の診断になるであろう。パラオキシナーゼもしくはアリアルエステラーゼに関するここに提示されるようなアッセイは、そのような診断方法の基礎になるであろう。その方法は、正常よりも高い心臓血管事象と相関関係にあるPON-1の表現型変異を発現するサブ集団間の遺伝的相違を評価することができる。例えば、PON-1 192Q表現型は、192R表現型よりも高いパラオキシナーゼ活性と相関していた。アッセイは、表現型を別々に測定するか、そして/または個人において存在するこれら2つの表現型の比を測定するかいずれかに基づいていて、それによって彼らのアテローム性動脈硬化症に対する個々の罹病性を予測することが期待されるであろう。

【0036】

また、遺伝子治療応用において、PON-1をコードしているDNA配列の使用が期待される。考えられる遺伝子治療応用は、アテローム硬化のような脂質酸化を減少するPON-1の能力により、有効な治療を提供することが期待されるそれらの疾病、ならびに脂質酸化レベルに対して別な応答をする疾病の治療を含む。LDLレセプターの発現の欠如によって発症する家族性高コレステロール血症は、循環するコレステロール、トリグリセリドおよび関連脂質の非常に高いレベルをもたらすような疾病の1つである。

【0037】

遺伝子治療を用いるPON-1の局所送達は、標的領域に治療剤を提供できる。両イン・ビトロおよびイン・ビボ遺伝子治療法が考えられる。一定の細胞集団に治療遺伝子を潜在的に伝達するいくつかの方法が知られている。例えば、Mulligan, "The Basic Science Of Gene Th

erapy", Science, 260:926-31 (1993)、参照。これらの方法は、次のものを含む：

1) 直接遺伝子伝達。例えば、Wolff et al., "Direct Gene transfer Into Mouse Muscle In Vivo", Science, 247:1465-68 (1990)、参照；

2) リポソーム媒介DNA伝達。例えば、Caplen et al., "Liposome-mediated CFTR Gene Transfer To The Nasal Epithelium Of Patients With Cystic Fibrosis", Nature Med. 3:39-46 (1995) ; Crystal, "The Gene As A Drug", Nature Med. 1:15-17 (1995) ; Gao and Huang, "A Novel Cationic Liposome Reagent For Efficient Transfection Of Mammalian Cells", Biochem. Biophys. Res. Comm., 179:280-85 (1991)、参照；

3) レトロウイルス媒介DNA伝達。例えば、Kay et al., "In Vivo Gene Therapy Of Hemophilia B:Sustained Partial Correction In Factor IX-Deficient Dogs", Science, 262:117-19 (1993) ; Anderson, "Human Gene Therapy", Science, 256:808-13 (1992)、参照。

【0038】

4) DNAウイルス媒介DNA伝達。そのようなウイルスは、アデノウイルス（好ましくは、Ad-2もしくはAd-5に基づくベクター）、ヘルペスウイルス（好ましくは、単純ヘルペスウイルスに基づくベクター）およびパルボウイルス（好ましくは、「欠陥」もしくは非自律性パルボウイルスに基づくベクター、より好ましくは、アデノ随伴ウイルスに基づくベクター、もっとも好ましくは、AAV-2に基づくベクター）を含む。例えば、Ali et al., "The Use Of DNA Virus As Vectors For Ge

ne Therapy", Gene Therapy, 1:367-84 (1994); 引用によって本明細書に組み入れられている米国特許第4,797,368号、および引用によって本明細書に組み入れられている米国特許第5,139,941号、参照。

【0039】

問題の遺伝子を伝達するための特定のベクター系の選択は、種々のファクターにより異なるであろう。1つの重要なファクターは、標的細胞集団の性質である。レトロウイルス・ベクターは広く研究され、そして多くの遺伝子治療応用において使用されているけれども、これらのベクターは、非分裂細胞に感染するには一般に適していない。さらに、レトロウイルスは、発がん性の可能性をもつ。

【0040】

アデノウイルスは、それらが広い宿主範囲をもち、静止状態もしくは最終分化細胞、例えばニューロンもしくは肝細胞に感染でき、そして本質的に発がん性を現わさないという利点をもつ。例えば、Ali et al., 前出、p. 367、参照。アデノウイルスは、宿主ゲノムへの組み込みはないようである。それらは、染色体外に存在するので、挿入変異誘発の危険性は、一般に減少される。Ali et al., 前出、p. 373。

【0041】

アデノ随伴ウイルスは、アデノウイルスに基づくベクターと類似の利点を示す。しかしながら、AAVは、ヒトの染色体19における部位特異的組み込みを示す。Ali et al., 前出、p. 377。

【0042】

好適な実施態様では、本発明のDNAをコードしているPON-1は、脂質に基づく疾患、例えばFH、および非インシュリン依存性真性糖尿病のような他の疾患から起こる心臓血管合併症のための遺伝子治療において使用される。

【0043】

この実施態様によれば、本発明のPON-1もしくはムテインをコードしているDNAによる遺伝子治療は、診断と同時に、またはその直後に、それを必要としている患者に提供される。

【0044】

熟達した技術者は、PON-1 DNAもしくはPON-1のムテインのDNAを含有するいずれの遺伝子治療ベクターも、この態様にしたがって使用されてもよいことを評価できる。そのようなベクターを構築する技術は既知である。例えば、Anderson, W. F., "Human Gene Therapy", Nature, 392:25-30 (1998); Verma, I. M., and Somia, N., "Gene Therapy-Promises, Problems, and Prospects," Nature, 389:239-242 (1998)、参照。PON-1 DNA含有ベクターの標的部位への導入は、既知の技術を用いて遂行することができる。さらに、本発明は、次の実施例によって具体的に説明されるが、これは、本発明を限定すると解釈されるべきではなく、それを支持するために使われるべきである。本明細書に言及されるすべての特許、特許出願および引用文献の内容は、引用によって完全に組み入れられている。

【0045】

実施例I. 方法

マウスおよび食餌. LDLR KOマウスモデルは、アテローム形成の分野における製薬候補の薬物学的活性を予測するために認識された動物モデルである。アテローム形成性LDLの除去のために必要なマウスのLDLレセプターは、相同性組み換えによって欠失されている (Ishibashi S., et al., "Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery," J. Clin. Invest. 92 (2):883-893 (1993))。これらのマウスは、高脂肪食餌を与えられた場合、それらの1次 (primary) 動脈中のアテローム形成 (脂肪条痕) に特に罹病性である。2カ月令メスのLDLレセプター・ノックアウト (LDLR KO) マウスは、Jackson Laboratory (Bar

Harbor, Maine) から購入され、そして6%脂肪チャウ (chow) 食餌 (Harlan Teklad, Madison, WI) で維持された。PONリブレースメント (replacement) 研究では、3カ月令の50匹のメスLDLR KOマウスが、1群当たり10マウスで次の5群に分けられた:

群1: 基礎群、0日目に犠牲にされた。

【0046】

群2: 4週チャウ食餌群、これらのマウスは、6%脂肪チャウ食餌を与えられ、そして28日目に犠牲にされた。PON-1活性は、群4および5においてパラオキシナーゼアッセイによって測定された。

【0047】

群3: 4週高脂肪食餌群、これらのマウスは、4週間高脂肪食餌を与えられ、そして28日目に犠牲にされた。

【0048】

群4: 4週高脂肪食餌+バッファー注射、これらのマウスは、4週間 (1日~28日目) 高脂肪食餌を与えられ、そして筋肉内へのバッファー注射80 μ lを、1, 3, 6, 8, 10, 13, 15および17日目に受けた。次いで、マウスは、腹腔内へのバッファー注射80 μ lを、20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27日目に受けた。次いで、マウスは、28日目に犠牲にされた。

【0049】

群5: 4週高脂肪食餌+PON注射、これらのマウスは、4週間 (1日~28日目) 高脂肪食餌を与えられ、そして筋肉内へのヒトPON-1 192Q (PON-1は、Bert LA Du (Gan, K. N., et al., "Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities," Drug Metab. Dispos. 19 (1):100-106 (1991) によって記述された方法を用いて、192Q変異について同型接合のヒト血漿ドナーから精製された) 注射80 μ l (800 μ g、パラオキシナーゼ活性290単位

)を、1, 3, 6, 8, 10, 13, 15および17日目に受けた。次いで、マウスは、腹腔内へのヒトPON-1 192Q注射80 μ lを、20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27日目に受けた。次いで、マウスは、28日目に犠牲にされた。

【0050】

高脂肪食餌は、15.75%脂肪、1.25%コレステロールおよび0.5%コール酸ナトリウム (Teklad, Madison, WI) を含有した。群4および5では、血漿PON-1活性は、両7日目 (i. m. 注射後24時間) および犠牲時点28日目 (i. p. 注射後24時間) に測定された。群1, 2および3では、PON-1活性は、犠牲時点で収集された血漿サンプルにおいて測定された。犠牲時点では、マウスは、一夜絶食され、そして殺された。血液、心臓および肝臓が、さらなる分析のために回収された。

【0051】

PON-1活性および脂質アッセイ. PON-1活性は、基質として有機リン酸エステルパラオキソンを用いるパラオキソナーゼアッセイ (Furlong, C. E. et al., "Spectrophotometric assays for the enzymatic hydrolysis of the active metabolites of chlorpyrifos and parathion by plasma paraoxonase/arylesterase," Anal. Biochem. 180:242-247 (1989)) か、または基質として酢酸フェニルを用いるアリールエステラーゼアッセイ (Furlong, C. E. et al., "Role of genetic polymorphism of human plasma paraoxonase/arylesterase in hydrolysis of the insecticide metabolites chlorpyrifos oxon and paraoxon," Am. J. Hum. Genet. 43:230-238 (1988)) か、いずれかによって測定された。簡単に言えば、パラオキソナーゼアッセイでは、血漿5 μ lが、1.2mMパラオキソン、2.0MNaCl、0.1MTris HCl

pH 8.5 および 2.0 mM CaCl₂ を含有する基質溶液と混合された。p-ニトロフェノールの生成が、室温で、5分にわたる 405 nm における吸光度 (O. D.) の変化として測定された。また、標準曲線は、種々の濃度の p-ニトロフェノールの O. D.₄₀₅ を測定することによって構築された。パラオキシナゼ活性 1 単位は、1 分間に生成される p-ニトロフェノール 1 nmole として定義される。アリールエステラーゼアッセイでは、血漿 1 μ l が、3.26 mM 酢酸フェニル、9.0 mM Tris HCl pH 8.0 および 0.9 mM CaCl₂ を含有する基質溶液 1 ml と混合された。フェノールの生成が、室温で、2 分にわたる 270 nm における吸光度 (O. D.) の変化として測定された。次いで、アリールエステラーゼ活性が、フェノールについてのモル吸光係数 ($1,310 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を用いて算出された。アリールエステラーゼ活性 1 単位は、1 分間に生成されるフェノール 1 μ mole として定義される。全群について、血漿総コレステロール、HDL コレステロール、VLDL/LDL コレステロールおよびトリグリセリドが、酵素の終点を用いる酵素的操作を使用して犠牲時点で収集された血漿サンプルにおいて測定された (Mehraban, M., et al., "Influence of the apoA-II gene locus on HDL levels and fatty streak development in mice," Arterioscler. Thromb. 13:1-10 (1993))。

【0052】

大動脈病変測定. 大動脈病変測定の使用は、犠牲時点で、心臓および基部動脈の上方部が得られ、そして OCT 化合物 (Tissue-Tek OCT Compound-Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA) 中に包埋され、そして凍結されることが必要である。大動脈弁が現れる場所から始まる厚さ 10 μ m 置きの凍結切片が、約 500 μ m の長さについて収集される。これらの切片は、オイルレッド O (Oil Red O, Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri) により染色され、そしてヘマトキシリン (Hematoxylin aqueous formula, Biomeda Corp., Foster

City, CA) および Fast Green (Fast Green FCF, Sigma, St. Louis, Missouri) で対比染色される。25 切片における脂質含有面積が、顕微鏡アイピース・グリッドを用いて決定される。次いで、切片当たりの平均病変面積が計算される (Mehrabian, M., et al., "Influence of the apoA-II gene locus on HDL levels and fatty streak development in mice," Arterioscler. Thromb. 13:1-10 (1993))。

【0053】

ウエスタンブロット解析. 種々の量の精製ヒトPON-1 192Q (40, 200, 100, 50 ng/lane) およびマウスHDL 1 μ l (マウス血漿 6 μ l に相当) が、電気泳動のために変性ポリアクリルアミドゲル上に負荷された (使用される変性剤: 2Xバッファー: 0.5M Tris-HCl, pH 6.8, 2.5ml; グリセロール, 2ml; 10% SDS, 4ml; 0.1% ブロモフェノールブルー, 0.5ml; β -メルカプトエタノール, 0.5ml; 水 10.0ml まで)。次いで、分画されたタンパク質が、ニトロセルロースペーパー (Hybond-ECL nitrocellulose, Amersham, Buckinghamshire, UK) 上に転移された。次いで、そのような同じニトロセルロースブロット4個が、次の溶液の1つと1時間インキュベートされた: (1) 注射4週後にバッファーを注射されたマウスからの保存血漿の1:500希釈液、(2) 注射4週後にヒトPON-1 192Qを注射されたマウスからの保存血漿の1:500希釈液、(3) 注射1週後にヒトPON-1 192Qを注射されたマウスからの保存血漿の1:500希釈液、(4) マウスPON-1に対するウサギ抗体の1:1000希釈液 (ウサギ抗マウスPON-1は、Diana Shih and Ling-jie Gu, 未公表結果、によるUCLAニオケルE. コリ (E. coli) で発現された組み換えマウスPON-1を用いて生成された)。次いで、ブロットは、0.1% Tween-20を含有するPBSで洗浄され、次いで、HRPと共役された抗ウサギIgG 2次抗体 (Amersham, Buckinghamshire, UK)

と1時間インキュベートされた。次いで、プロットは洗浄され、そして画像が、AmershamからのECLウエスタンブロッティング検出試薬 (Amersham, Life Science, Inc., Arlington Heights, Illinois) を用いて可視化された。

【0054】

II. 実施例

例1. ヒトPON-1 192Qを注射されたLDLR KOマウスにおける血漿PON-1活性の経時的研究

chow食餌で維持された3匹のメスLDLR KOマウスは、各々、ヒトPON-1 192Qの290単位が筋肉内へ注射された。血液サンプルが、注射直前(時間0)、および注射後8、24および48時間に収集された。次いで、血漿PON-1活性が、アリアルエステラーゼアッセイを用いて測定された。図1に示されるように、注射後8、24および48時間における平均血漿PON-1活性は、時間0の活性の107%、125%、109%であった(時間0対24時間、 $p=0.003$)。このデータは、筋肉内注射が、マウス中にPON-1を送達する効果的な方法であることを示している。しかしながら、これらのマウスにおけるPON-1活性の増加は、期待されたよりも小さかった。

【0055】

例2. PON-1 192Qリプレースメント研究

実験計画は、既に方法において記述された。群4(4週高脂肪食餌+バッファ-注射)および群5(4週高脂肪食餌+ヒトPON-1 192Q 290単位注射)では、血漿PON-1活性は、7日目、第3回筋肉内注射後24時間に測定された。7日目には、各群10マウスであった;示される値は、2つの独立パラオキシナーゼアッセイからの平均値である。28日目には、各群9マウスであった;パラオキシナーゼアッセイ。

【0056】

図2Aおよび2Bに示されるように、7日目では、高脂肪食餌+PON-1注射群は、高脂肪+バッファ-注射群に比較して27%高いPON-1活性を示すことが分かった($p=0.03$)(図2A)。しかしながら、28日目には(図

2B)、高脂肪食餌+PON-1注射群は、高脂肪+バッファ注射群のそれに比較して50%のPON-1活性をもつだけであることが分かった($p < 0.001$)。本発明者らは、28日目におけるPON-1注射群のPON-1活性減少は、注射されたヒトPON-1 192Qに対するマウスの免疫応答によって多分惹起されたと考えた。

【0057】

例3. ヒトPON-1を注射されたLDLR KOマウスにおける抗ヒトPON-1抗体の検出

種々の量の精製ヒトPON-1 192Q (400, 200, 100, 50 ng/lane) およびマウスHDL 1 μ l (マウス血漿6 μ lに相当)が、電気泳動のために変性ポリアクリルアミドゲル上に負荷された。次いで、分画されたタンパク質が、ニトロセルロースペーパー上に転移された。具体的には、図3A~Dに関して、これらの同じニトロセルロースブロット4個が、次いで、次の溶液の1つと1時間インキュベートされた：パネルA、バッファ注射4週後にバッファを注射されたマウスからの保存血漿の1:500希釈液；パネルB、注射4週後にヒトPON-1 192Qを注射されたマウスからの保存血漿の1:500希釈液；パネルC、注射1週後にヒトPON-1 192Qを注射されたマウスからの保存血漿の1:500希釈液；そしてパネルD、マウスPON-1に対するウサギ抗体の1:1000希釈液。次いで、ブロットは、0.1% Tween-20を含有するPBSで洗浄され、そしてHRPと共役された2次抗体と1時間インキュベートされた。次いで、ブロットは洗浄され、そして画像が、ECL技術を用いて可視化された。パネルAに示されるように、4週バッファ注射マウスは、それらの血漿中にヒトPON-1に対する抗体をもたなかったが、一方4週PON-1注射マウスは、それらの血漿中にヒトPON-1に対する抗体を含有した(パネルB)。1週PON-1注射マウスの血漿中には、いかなる抗ヒトPON-1抗体も検出されなかった(パネルC)。パネルDに示されるように、ウサギ抗マウスPON-1抗体は、マウスPON-1と、より少ないが、ヒトPON-1の両方を検出した。

【0058】

28日目においてPON-1注射動物におけるPON-1活性の低下は、ヒトPON-1に対する抗体がマウスPON-1タンパク質と交差反応しなかったので、マウスPON-1と抗体間の相互作用によって直接惹起されることは考えられない。ヒトPON-1は、マウスPON-1と同じHDL粒子上に存在していると思われるので、抗体によるHDL粒子を含有するPON-1の認識が、これらのHDL粒子のクリアランスを促進し、かくして同じ粒子上のマウスPON-1の除去を惹起するのであろう。

【0059】

例4. 脂質レベル

犠牲時に回収された血漿サンプルの脂質レベルが検査された。表1に示されるように、4週高脂肪+バッファ注射マウスと4週高脂肪群の間の血漿脂質レベルには有意な差異はなかった。興味あることは、バッファ注射マウスと比較して、PON-1注射マウスは、両総コレステロール ($p=0.04$) およびVLDL/LDLコレステロール ($p=0.04$) レベルにおいて少しの減少と、トリグリセリド ($p=0.005$) において少しの増加があり、そしてHDLコレステロールレベルにおいては差異がなかった。したがって、PON-1注射マウスは、バッファ注射群に比較して少ないアテローム形成性脂質プロファイルを有した。

【0060】

【表1】

表1:

犠牲時点でのLDLR KOマウスの血漿PON-1活性および脂質レベル

	PON-1活性 ¹	総コレステロール ²	VLDL/LDL コレステロール ²	HDL コレステロール ²	トリグリセリド ²
基礎	329 ± 21	291 ± 15	206 ± 17	86 ± 3	162 ± 16
4週 Chow	420 ± 11	332 ± 10	230 ± 10	101 ± 2	318 ± 25
4週 HF ³	105 ± 6	2315 ± 175	2289 ± 174	27 ± 3	44 ± 11
4週 HF ³ + Buffer	112 ± 9	2213 ± 145	2190 ± 145	23 ± 2	26 ± 4
4週 HF ³ + PON-1	56 ± 5	1862 ± 63	1836 ± 62	26 ± 2	44 ± 4

¹ 示される値は、各群9～10動物の平均値±S.E.である。
単位は、パラオキソナーゼ活性単位/血漿mlである。

² 示される値は、各群9～10動物の平均値±S.E.である。
単位は、mg/dlである。

³ HFは高脂肪食餌を意味する。

【0061】

例5. 大動脈病変

本発明者らは、次ぎに、これらのマウスにおける大動脈脂肪条痕形成を検査した。3カ月令メスLDLR KOマウス(10マウス/群)が、0日目に犠牲にされるか(基礎群)、4週間chow食餌を供与(4週chow)、4週間高脂肪食餌を供与(4週HF)、高脂肪食餌供与+バッファー注射(4週HF+バッファー)、または高脂肪食餌供与+ヒトPON-1 192Q注射(4週HF+PON)のいずれかを実施された。4週処置の終了時点で、マウスは犠牲にされた。心臓が回収され、そして大動脈病変面積がスコアされた。群4(4週HF+バッファー)および群5(4週HF+PON)では、病変サイズは、ノンブラインド(non-blind)で1回、そしてバイアスを避けるためにブラインド様式で1回スコアされた。両時点のスコアは非常に類似していた。4週高脂肪および4週高脂肪+バッファー注射群の間の大動脈病変サイズには有意な差異を見

いだせなかった(図4)。ノンブラインド・スコアリングからは、バッファー注射(群4)およびPON-1注射(群5)群の平均病変サイズは、それぞれ、 4222 ± 8008 および $12864 \pm 1985 \text{ mm}^2$ /切片であった。ブラインド・スコアリングからは、バッファー注射およびPON-1注射群の平均病変サイズは、それぞれ、 32422 ± 7470 および $13383 \pm 1850 \text{ mm}^2$ /切片であった。したがって、ブラインドもしくはノンブラインド法いずれを用いても、非常に類似する結果が得られ、4週高脂肪+PON-1 192Q注射群が、4週高脂肪+バッファー注射群および4週高脂肪群の両方よりも有意に小さい大動脈病変面積をもつことが例証された。その結果は、PON-1リプレースメントが、LDLR KOマウスにおいて大動脈脂肪条痕を低下させる効果的な方法であることを示唆している。

【0062】

総括すれば、PON-1 192Qを注射されたマウスは、バッファーを注射されたマウスに比較すると、7日目には、上昇したPON-1活性を、そして28日目には、より低いレベルのPON-1活性をもつことが分かった。しかしながら、大動脈病変形成が28日目に検査された場合、大動脈病変サイズにおける驚くべきほど大きい60%(近似)の減少が、バッファーを注射されたマウスに比較して、PON-1 192Qを注射されたマウスにおいて見いだされた。28日目におけるPON-1処置マウスの低いPON-1活性の可能な説明は、次のとおりである：第1に、PON-1注射マウスにおけるヒトPON-1 192Qに対する抗体の生成とタイターは、多分、遅れて始まり、そして実験終了まで低く留まる。それ故、研究中のほとんどの時間、注射されたPON-1 192Qは、LDL酸化と、したがってアテローム硬化を防ぐことに効果的であった。第2に、PON-1が、アテローム硬化の開始を防ぐこと、すなわちLDL酸化の防止、したがって免疫応答の防止、そして内皮下細胞中への単球補充の低下(Mackness, M. I., et al., 前出; Watson, A. D., et al., 前出; Shih, D. M. et al., "Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and a

therosclerosis, " Nature 394:284-287 (1998)) においてもっとも効果的であると仮定すれば、PONリプレースメントは、研究の最後の2週よりもむしろ研究の最初の2週の間にもっとも効果的であったであろう。したがって、PON-1注射マウスが、28日の実験の最後においてバッファ注射マウスよりも低いPON-1活性をもったとしても、それらは、なお大動脈病変を発達させることはほとんどなかった。

【0063】

当業者は、本明細書に記述される本発明の特定の態様との多くの等価物を認識するか、またはこれ以上の日常の実験を使用せずに確認するすることができるであろう。例えば、PON-2およびPON-3は、PON-1と類似の抗酸化活性をもち、そして本発明の方法において同等に有用であろう。また、他の欠失もしくは置換変異も、類似の機能的等価物を提供するであろう。そのような等価物は、次の特許請求の精神および範囲によって包含されることを意図する。

【図面の簡単な説明】

【図1】

ヒトPON-1 192Qの290単位により筋肉内(i. m.)注射を受けた後の、LDLR KOマウスの血漿PON-1 (アリアルエステラーゼ・アッセイ) 活性のグラフによる表示である。マウスは、指示された時間(0, 8, 24および48時間)飼育され、そしてPON-1活性が測定された。

【図2Aおよび2B】

いずれか7日目(図2A)もしくは28日目(図2B)に注射後24時間のマウス血清中に存在するヒトPON-1量を示す棒グラフである。対照マウスはバッファを受けた。

【図3Aから3D】

研究経過にわたって、ヒトPON-1により治療されたマウスにおける抗ヒトPON-1抗体の生成を示すウエスタンブロットである。

【図4】

PON-1治療群対対照治療群におけるLDLR KOマウスの大動脈病変サイズを比較する棒グラフである。

【図1】

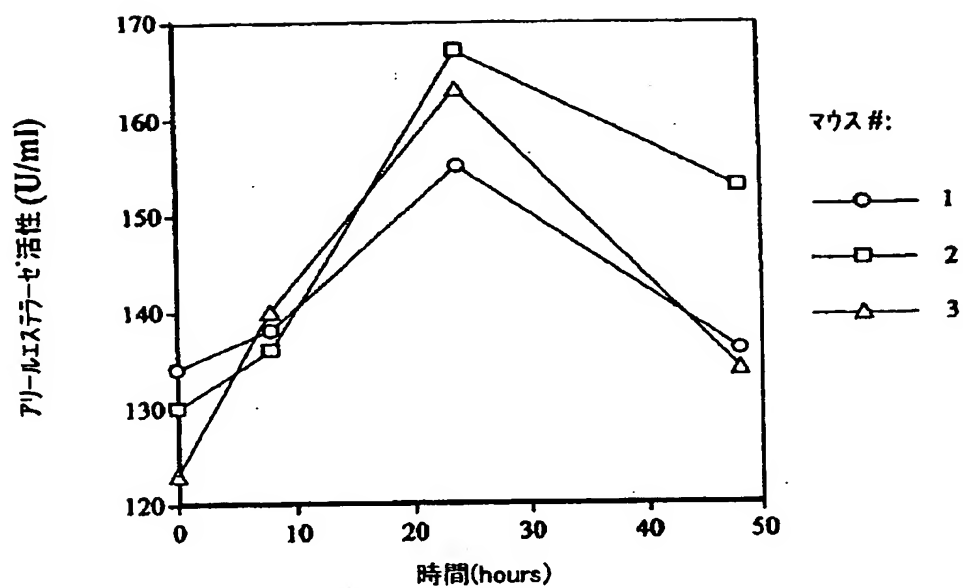


FIG. 1

【図2】

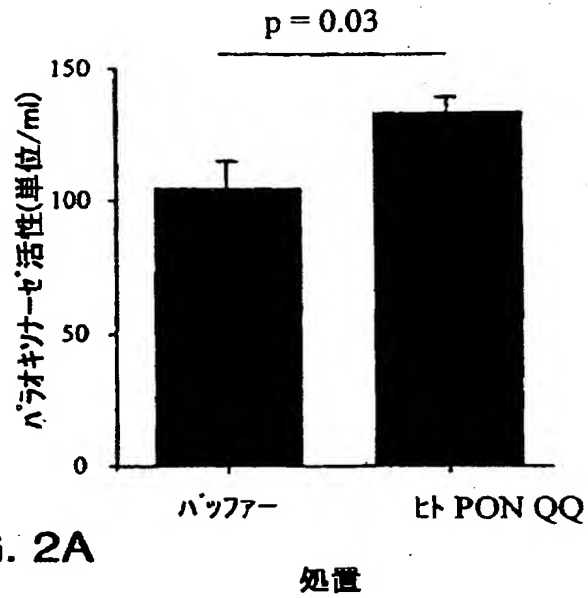


FIG. 2A

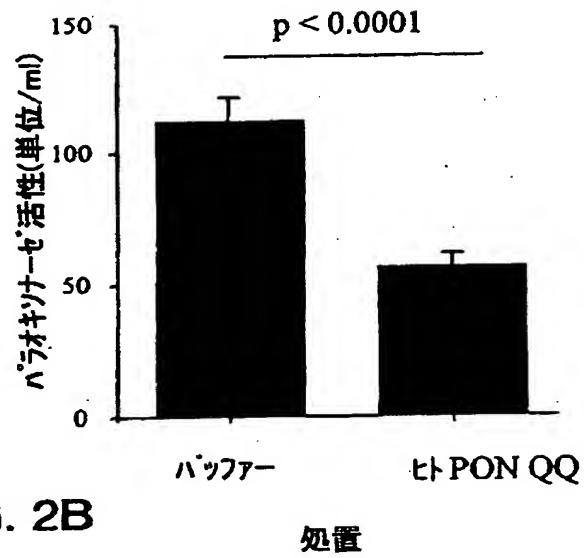


FIG. 2B

【図3】

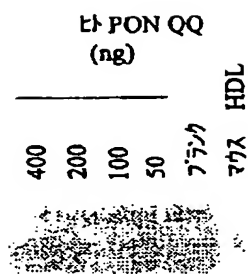


FIG. 3A

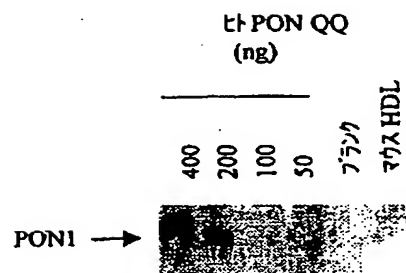


FIG. 3B

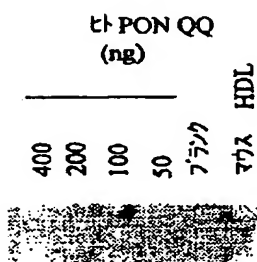


FIG. 3C

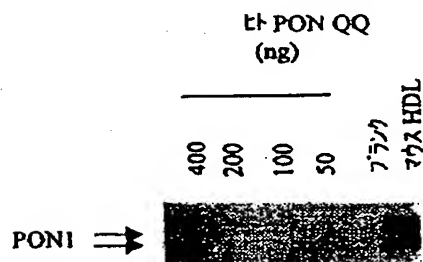


FIG. 3D

【図4】

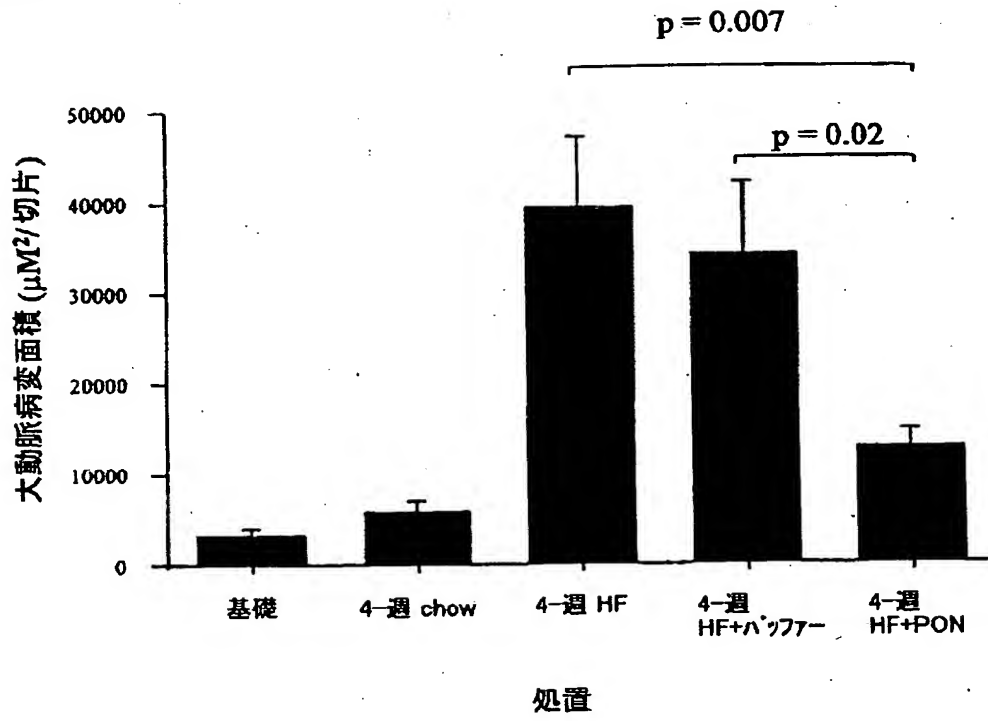


FIG. 4

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K38/46 A61K48/00 C12Q1/44 A61P9/10		International Application No. PCT/US 99/27806
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 792 639 A (HE WEI WU ET AL) 11 August 1998 (1998-08-11) cited in the application the whole document.	8
A	MACKNESS BHARTI ET AL: "Human serum paraoxonase." GENERAL PHARMACOLOGY, vol. 31, no. 3, September 1998 (1998-09), pages 329-336, XP000907512 ISSN: 0306-3623 the whole document	1-10
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" documents member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 31 May 2000		Date of mailing of the international search report 15/06/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 6518 Patentean 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tr. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3010		Authorized officer Stein, A

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 99/27806

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MACKNESS MICHAEL I ET AL: "Paraoxonase and coronary heart disease." CURRENT OPINION IN LIPIDOLGY, vol. 9, no. 4, August 1998 (1998-08), pages 319-324, XP000907517 ISSN: 0957-9672 the whole document	1-10
A	MACKNESS M I ET AL: "SERUM PARAOXONASE ACTIVITY IN FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA AND INSULIN-DEPENDENT DIABETES MELLITUS" ATHEROSCLEROSIS 1991, vol. 86, no. 2-3, 1991, pages 193-200, XP000907547 ISSN: 0021-9150 the whole document	7
P,X	RADTKE K -P ET AL: "Paraoxonase substitution inhibits arteriosclerotic lesion formation in LDL-receptor knock-out mice." BLOOD, vol. 94, no. 10 SUPPL. 1 PART 1, 15 November 1999 (1999-11-15), page 448a XP002139177 ISSN: 0006-4971 the whole document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 99/ 27806

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 1-6,9 and 10 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claim 7 so far as in vivo method is concerned is directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 99/27806

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5792639 A	11-08-1998	US 5629193 A	13-05-1997
		AU 1853799 A	13-05-1999
		AU 704834 B	06-05-1999
		AU 2950795 A	25-01-1996
		CN 1151760 A	11-06-1997
		EP 0804591 A	05-11-1997
		JP 10502255 T	03-03-1998
		NZ 289607 A	25-11-1998
		WO 9601322 A	18-01-1996

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	識別記号	F I	マーク (参考)
A 6 1 P 9/10		A 6 1 P 39/06	
39/06		C 1 2 Q 1/42	
C 1 2 Q 1/42		G 0 1 N 33/68	
G 0 1 N 33/68		33/92	B
// G 0 1 N 33/92		A 6 1 K 37/54	
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, C Z, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, J P, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, L S, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, T T, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
Fターム(参考)	2G045 AA13 AA25 CA25 CA26 DA20 DA36 DA62 DA69 FB01 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ33 QQ61 QR13 QR41 QR72 4C084 AA02 AA03 AA13 AA17 BA44 CA62 DC01 MA13 MA17 MA22 MA23 MA24 MA28 MA31 MA35 MA36 MA37 MA52 MA57 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA362 ZC332 ZC412 4C086 AA02 EA16 MA01 MA04 MA13 MA17 MA22 MA23 MA24 MA28 MA31 MA35 MA36 MA37 MA52 MA57 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA36 ZC33 ZC41 4C087 AA01 AA02 BC83 CA20 CA47 MA01 MA13 MA17 MA22 MA23 MA24 MA28 MA31 MA35 MA36 MA37 MA52 MA57 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA36 ZC33 ZC41		